



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN AGRICULTURA ANDINA**



**TESIS**  
**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y**  
**EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN FRUTOS DE**  
**MULLACA (*Muehlenbeckia volcánica*)**

**PRESENTADA POR:**  
**RUTH MERY CCOPA FLORES**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**  
**MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ANDINA, ESPECIALIDAD DE**  
**CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**PUNO, PERÚ**  
**2021**

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN FRUTOS DE MULLACA (Muehlenbeckia volcánica)**

AUTOR

**RUTH MERY CCOPA FLORES**

RECUENTO DE PALABRAS

**18824 Words**

RECUENTO DE CARACTERES

**101540 Characters**

RECUENTO DE PÁGINAS

**86 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**1.7MB**

FECHA DE ENTREGA

**Sep 13, 2023 2:32 PM GMT-5**

FECHA DEL INFORME

**Sep 13, 2023 2:34 PM GMT-5**

● **16% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos:

- 15% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 7% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)



Dr. Alejandro Coloma Paxi  
INGENIERO AGROINDUSTRIAL  
CIP: 68697



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
ESCUELA DE POSGRADO  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN  
Dr. Jared Luzue Costa  
AL ESTADÍSTICO E INFORMÁTICO  
C.I.A. 115625

Resumen



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

## ESCUELA DE POSGRADO

### MAESTRÍA EN AGRICULTURA ANDINA



### TESIS

## OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN FRUTOS DE MULLACA (*Muehlenbeckia volcánica*)

PRESENTADA POR:

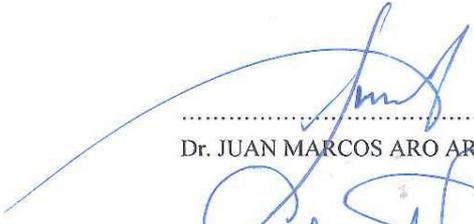
RUTH MERY CCOPA FLORES

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

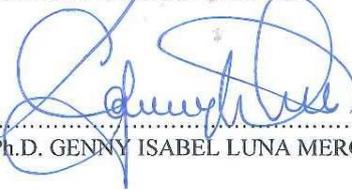
MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ANDINA, ESPECIALIDAD DE  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

PRESIDENTE

  
.....  
Dr. JUAN MARCOS ARO ARO

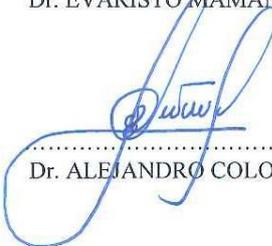
PRIMER MIEMBRO

  
.....  
Ph.D. GENNY ISABEL LUNA MERCADO

SEGUNDO MIEMBRO

  
.....  
Dr. EVARISTO MAMANI MAMANI

ASESOR DE TESIS

  
.....  
Dr. ALEJANDRO COLOMA PAXI

Puno, 22 de diciembre de 2021

ÁREA: Ciencias de la Ingeniería  
TEMA: Compuesto bioactivos  
LÍNEA: Tecnología de los alimentos



## DEDICATORIA

*Doy gracias a mi padre celestial,  
que me dio la vida, por su  
cuidado, por guiarme en este  
camino de la vida para alcanzar  
las metas trazadas.*

*A mis padres: Vicente Ccopa Vilca  
y María Flores Flores, agradezco  
todo su apoyo, amor, orientación y  
sus consejos en cada fase de la  
vida, me inspiran a seguir adelante.*

*A mi amada hija: Diana Nayeli,  
por ser mi compañera de vida, la  
razón que día a día fortalece mi  
andar en esta vida.*

*Gracias a Beatriz, Edith, Josafat,  
Jonatan y Jhoel, mis hermanos, por  
su apoyo incondicional, deseo de  
verme triunfar y confianza en mí.*

*Agradezco la fortaleza y apoyo de  
mi pareja y mejor amigo, Densi  
Heber.*

Ruth



## AGRADECIMIENTO

- En primer lugar, doy gracias a Dios por darme vida, por estar a mí lado durante toda mi vida y por brindarme sabiduría e inteligencia en aquellos momentos difíciles y vulnerables.
- Mi eterno reconocimiento: Universidad Nacional del Altiplano-PUNO y Universidad Micaela Bastidas de Apurímac, por haberme brindado muchas oportunidades y enriquecerme en conocimientos, de igual forma a mis asesores: Dr. Alejandro Coloma Paxi y Dr. Melquiades Barragán Condori.
- Agradecer a los miembros del jurado: Dr. Juan Marco Aro Aro, Ph.D. Genny Isabel Luna Mercado y Dr. Evaristo Mamani Mamani, que gracias a sus consejos acertados sugerencias, orientaciones y apoyo han hecho que la tesis se realice con éxito.
- Agradezco a mis padres, hermanos y familiares por estar siempre a mi lado, por su orientación moral y valores, permítanme expresarles mi gratitud.

Ruth



## ÍNDICE DE GENERAL

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE DE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1

### CAPÍTULO I

#### REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco Teórico	3
1.1.1 Descripción Botánica	3
1.1.2 Nombre científico	6
1.1.3 Nombre común	6
1.1.4 Clasificación taxonómica:	6
1.1.5 Composición química y nutricional de Mullaca	6
1.1.6 Parte utilizada Mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> )	7
1.1.7 Pigmentos en plantas tintóreas	7
1.1.8 Polifenoles	7
1.1.9 Compuestos antioxidantes	14
1.1.10 Capacidad antioxidante	15
1.1.11 Extracción de antocianinas	15
1.1.12 Factores que influyen en la extracción	15
1.1.13 Estabilidad de antocianinas	16
1.1.14 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas	17
1.2 Antecedentes	22

### CAPÍTULO II

#### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema	27
2.2 Enunciados del problema	28
	iii



2.2.1 Problema general	28
2.2.2 Problema específico	28
2.3 Justificación	28
2.4 Objetivos	29
2.4.1 Objetivo general	29
2.4.2 Objetivo específico	29
2.5. Hipótesis	30
2.5.1 Hipótesis general	30
2.5.2 Hipótesis específicas	30
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1 Lugar de estudio	31
3.2 Población	31
3.3 Muestra	31
3.4 Métodos	32
3.5 Descripción detallada de métodos por objetivos específicos	33
3.5.1 Factores de estudio	33
3.5.2 Descripción para la obtención de antocianinas y evaluación de compuestos bioactivos	37
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 Resultados	46
4.1.1 Optimización del proceso de extracción (temperatura, pH y tiempo) de antocianinas totales en frutos de mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	46
4.1.2 Compuestos bioactivos de mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> )	51
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	59
ANEXOS	67



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
1. Compuestos polifenólicos más comunes en vegetales	8
2. Contenido total de fenoles en algunos alimentos.	9
3. Estructura básica y sustituyente de las antocianidinas – aglicona.	12
4. Diseño experimental con variables y niveles	34
5. Condiciones para el análisis por HPLC para antocianinas	42
6. Tratamientos obtenidos mediante el Diseño Compuesto Central (DCCR) + estrella	45
7. Resultado de los tratamientos obtenidos mediante el DSR.	47
8. Resultados estimados parara el contenido de antocianinas totales CAT (mg cianidina-3- glucósido/100g)	49
9. Resultado de comparativo del contenido de antocianinas totales.	51
10. Contenido de antocianidinas individuales identificadas en el extracto de mullaca- HPLC	53
11. Contenido de antocianinas, polifenoles totales y actividad antioxidante en mullaca.	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
1. Mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	4
2. Mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	4
3. Mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> )- raíz.	4
4. Mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> )-frutos.	5
5. Estructura básica de un flavonoide	10
6. Estructura y sustituyentes de las antocianinas.	12
7. Estructura más común de la antociana glucosilada	12
8. Estructura molecular de algunas antocianinas comunes.	13
9. Superficies de respuesta: a) descrita por un modelo de primer orden; b), c) y d) descritas por modelos de segundo orden.	21
10. Frutos de mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	32
11. Frutos de mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	32
12. Diagrama de flujo para la obtención de antocianinas y evaluación de compuestos bioactivos de la mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	36
13. Gráfica de superficie de respuesta con su respectivo contorno para el contenido de antocianinas de extracto de mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	48
14. Gráfica de superficie de respuesta con su respectivo contorno para el contenido de antocianinas de extracto de mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	48
15. Antocianinas- Cromatograma de HPLC en extracto de Mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> )	52
16. Antocianidinas-Cromatograma de HPLC en extracto de Mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ).	53
17. UV Vis de extractos de mullaca ( <i>Muehlenbeckia volcánica</i> ) comparado con antocianinas obtenidas a partir de los frutos de uva y fresa.	54



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Frutos de <i>Muehlembeckia volcánica</i> (MULLACA).	67
2. Extracción y filtración de pigmentos antociánicos de muestras de frutos de <i>Muehlembeckia volcánica</i> (MULLACA).	67
3. Contenido de antocianinas Totales CAT por método pH diferencial. Muestra de tratamientos.	68
4. Espectrómetro FTIR – ATR de antocianinas	69
5. Análisis de varianza (ANOVA) de contenido de antocianinas totales- CAT	70
6. Coeficientes de regresión para predecir el contenido de antocianinas totales-CAT (mg cianidina 3-glucosido/100g).	70
7. Cromatograma de HPLC – Cuantificación de antocianinas	71
8. Declaración jurada de autenticidad de tesis	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
9. Autorización para el deposito de tesis o trabajo de investigación en el repositorio institucional	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## RESUMEN

Las antocianinas, que tienen propiedades funcionales y bioactivas como antioxidantes, se encuentran entre los compuestos presentes en este fruto. Por tanto, el objetivo principal del estudio es optimizar el proceso de extracción de antocianinas totales y evaluar los compuestos bioactivos en frutos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*). La variable respuesta fue el contenido de antocianinas totales, el cual se determinó mediante el método de pH diferencial y en el proceso de extracción se utilizó metanol acidificado con HCL al 0,01%. Los tres factores de extracción (temperatura, pH y tiempo) se evaluaron mejor utilizando la metodología de superficie de respuesta (optimización) utilizando el diseño central compuesto DCCR  $2^3$  + estrella, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para calcular los polifenoles totales (PFT) y el método DPPH para calcular la capacidad antioxidante. Esto conduce a una combinación variable que optimiza el contenido de total de las antocianinas (temperatura de 37,6 °C, pH 3.0 y tiempo de 340 minutos); el contenido total de antocianinas después de la optimización mediante cromatografía líquida HPLC fue de  $140,90 \pm 0,02$  (mg cianidina 3- glucosido/100g); el cromatograma HPLC del extracto también mostró que contenía los siguientes tipos de antocianidinas: delfinidina (76,3%), cianidina (20,5%) y petunidina (3,1%) las cuales estaban presentes en el fruto de mullaca; el resultado del total de polifenoles es de  $200 \pm 43$  (mg de ácido gálico/100g) y capacidad antioxidante de  $25.2 \pm 0.57$  ( $\mu\text{mol}$  trolox/g); considerando a la mullaca un fruto con potencial bioactivo benéfico para la salud, industria alimentaria y puede utilizarse como alimento funcional.

**Palabras clave:** Antocianina, bioactivos, compuestos, extracción, mullaca, optimización.

## ABSTRACT

Anthocyanins, which have functional and bioactive properties as antioxidants, are among the compounds present in this fruit. Therefore, the main objective of the study is to optimize the extraction process of total anthocyanins and to evaluate the bioactive compounds in mullaca (*Muehlenbeckia volcanica*) fruits. The response variable was the total anthocyanin content, which was determined by the differential pH method, and methanol acidified with 0.01% HCL was used in the extraction process. The three extraction factors (temperature, pH and time) were best evaluated using response surface methodology (optimization) using the central composite design DCCR 23 + star, the Folin-Ciocalteu method was used to calculate total polyphenols (TPP) and the DPPH method was used to calculate the antioxidant capacity. This leads to a variable combination that optimizes the total anthocyanin content (temperature of 37.6 °C, pH 3.0 and time 340 min); the total anthocyanin content after optimization by HPLC liquid chromatography was  $140.90 \pm 0.02$  (mg cyanidin 3- glucoside/100g); HPLC chromatogram of the extract also showed that it contained the following types of anthocyanidins: delphinidin (76.3%), cyanidin (20.5%) and petunidin (3.1%) which were present in the mullaca fruit; the result of the total polyphenols is  $200 \pm 43$  (mg gallic acid/100g) and antioxidant capacity of  $25.2 \pm 0.57$  ( $\mu\text{mol trolox/g}$ ); considering mullaca a fruit with bioactive potential beneficial to health, food industry and can be used as functional food.

**Keywords:** Anthocyanin, bioactive, compounds, extraction, mullaca, optimization.

## INTRODUCCIÓN

El clima y la ubicación geográfica del Perú en relación con los principales mercados mundiales son dos factores claves que hacen que la agricultura peruana sea competitiva en la competencia internacional. Perú tiene 84 de los 108 tipos de clima que se encuentran en el mundo, lo que permite que la agricultura produzca una amplia gama de plantas, animales y especies forestales (MINAGRI, 2017). Al igual que frutos nativos con alto valor funcional y bioactivo como la Mullaca.

Navarro (2018) Señala que desde tiempos atrás, se han realizado investigaciones sobre un determinado tipo de compuestos conocidos como antioxidantes, pero al mismo tiempo ha aumentado la incidencia y aparición de enfermedades provocadas por el bajo consumo de estos compuestos; la mayoría de las enfermedades crónicas no transmisibles que experimentan las personas hoy en día están relacionadas con la desnutrición (Zamora, 2007); además las causas de muerte más importantes entre ellas son las enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (Evans, 2000); así mismo excelentes antioxidantes son los compuestos fenólicos porque se unen con proteínas o iones y eliminan los radicales libres. Los extractos de frutas (manzanas, uvas, duraznos y fresas), cebolla, semillas, raíces y hierbas son fuentes ricas en compuestos fenólicos (Cai *et al.*, 2019; Canalis *et al.*, 2020).

El método de la superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas estadísticas y matemáticas que se ha utilizado ampliamente para estudiar factores de proceso y sus interacciones (Chandra *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2015); la MSR crea modelos matemáticos para explicar la interacción de factores experimentales y llegar a valores óptimos, lo que no solo reduce significativamente el número de ensayos experimentales necesarios para optimizar las condiciones de extracción (Wang *et al.*, 2019; Tao *et al.*, 2015); además (Xu *et al.*, 2018) menciona que es una técnica estadística útil para optimizar procesos complejos; no obstante esta metodología se ha utilizado ampliamente para optimizar las variables del proceso de extracción, como en la extracción de polisacáridos, flavonas, compuestos fenólicos y proteínas de diversos materiales (Cai *et al.*, 2019).

Barragan *et al.* (2020) Realizaron el estudio sobre la caracterización, cuantificación y evaluación de la actividad antioxidante de los extractos del fruto de Mullaca se encontraron en una revisión de la literatura científica muestran algunos estudios que los frutos morados u oscuros contienen altos niveles de compuestos bioactivos (flavonoides),

que son comparables a los que se encuentran en las fuentes consideradas sustancias antioxidantes. De tal forma que los compuestos fenólicos, uno de los oligoelementos que se encuentran en el reino vegetal, desempeñan un papel importante en la nutrición tanto de las personas como de los animales (Martínez *et al.*, 2020; Pacheco, 2020); por ello la fruta también se destaca por tener una alta concentración de flavonoides, que son glucósidos de antocianidinas que es la aglicona, a las que se unen los azúcares mediante enlaces  $\beta$ -glucosídicos (Welch *et al.*, 2008).

Aunque existen antioxidantes artificiales, estos conllevan riesgos como efectos tóxicos, por lo que es importante seguir buscando nuevos componentes antioxidantes de origen vegetal; por esta razón se seleccionó frutos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*) con contenido de antocianinas con potencial antioxidante y bioactivo con el fin de optimizar su extracción y cuantificar los compuestos bioactivos; el contenido de antocianinas se determinó a través del método pH diferencial y un método colorimétrico redox que utiliza un agente oxidante reactivo Folin-Ciocalteu como base para la espectrofotometría. Se utilizó cromatografía líquida HPLC para la identificación y cuantificación recomendado por (Barragán y Aro, 2017). Para asegurar la capacidad antioxidante del extracto, mediante la técnica DPPH y utilizando el patrón de referencia trolox de 0 a 800 ( $\mu\text{mol/L}$ ). El estudio tuvo como objetivo principal evaluar los compuestos bioactivos previo a la optimización del proceso de extracción del total de antocianinas en frutos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*).

El trabajo de investigación se divide en cuatro capítulos: Capítulo I. Las bases teóricas del estudio, la teoría central y teoría de referencia correspondientes a la variable dependiente y variable independiente, objetivos de la investigación e hipótesis. Capítulo II. El problema que refiere a abordar las interrogantes que conducen al planteamiento del problema seguida de la justificación. El Capítulo III describe la metodología de la investigación, indicando los métodos utilizados, diseño tipo y nivel de investigación que determinan la dirección de la investigación, así como el alcance del estudio de la muestra, los métodos y herramientas que permiten obtener la información. Capítulo IV Resultados y discusión. Los resultados se asignan al uso de herramientas en diversos cuadros estadísticos para comparar hipótesis; finalmente se proporcionan conclusiones, recomendaciones, bibliografía revisada junto con los anexos referidos.

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1 Marco Teórico

##### 1.1.1 Descripción Botánica

Según Agapito y Sung (2005) el sub-arbusto conocido como Mullaca es comúnmente conocido como *Muehlenbeckia volcánica* Benth and Endlicher.

- Recibe su nombre de "volcánica" porque crece entre rocas eruptivas (Figura 1).
- Un pequeño arbusto que crece principalmente en las tierras altas de los Andes; es lampiño, muy ramificada y semitrepadora (Figura 2).
- Según Villareal *et al.* (2020) las hojas son pequeñas, casi redondas, de color verde oscuro, carnosas y tienen un tinte azul oscuro que antiguamente se utilizaba para colorear las fibras textiles.
- Sus flores son racimos terminales de color morado con cinco pétalos.
- Florece en noviembre.
- Raíces fibrosas y ramificadas (Figura 3).
- Frutos pequeños (Figura 4).

Según Lagos y Quinto (2018); Teves y Torres (2011), los frutos son aplanados, de color negro azulado y más o menos carnosos.



*Figura 1.* Mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*).  
Fuente:(Agapito y Sung, 2005)



*Figura 2.* Mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*).  
Fuente: Recuperado de <https://animalesplantasdeperu.blogspot.com>



*Figura 3.* Mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*)- raíz.  
Fuente: (Agapito y Sung, 2005)



Figura 4. Mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*)-frutos.  
Fuente: (Agapito y Sung, 2005)

- **Distribución y hábitat**

Arbusto silvestre que se desarrolla en ambientes cálidos, laderas abiertas y cálidas con suelo seco, rocoso y arcillosos, entre 2400-4200 m.s.n.m., crece en la Sierra peruana. En Perú, el género *Muehlenbeckia* tiene alrededor de 9 especies, la variedad Mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*) se encuentra presente en las regiones de Cusco, Huánuco, Junín, Lima, La Libertad Ancash, Ayacucho, Cajamarca, y Puno (Teves y Torres, 2011). Además, Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Bolivia y Ecuador se encuentran entre las naciones donde estas especie de plantasse encuentran ampliamente distribuidas (Pavlow y Roersch, 2018). Hay dos clases con mayor valor. Se valoran mucho los beneficios medicinales de la *Muehlenbeckia volcánica*, una planta rastrera que se adhiere a las rocas ígneas, esta clase, del mismo modo que la *Muehlenbeckia tamnifolia* que es muy parecido a la anterior clase, de hojas y tamaño que reflejan las minúsculas diferencias morfológicas y crece mejor en los templados valles andinos (Cornejo, 1986).

- **Antecedentes Históricos**

De-La-Cruz *et al.* (2007) El nombre "mullaca" hace referencia a una planta originaria de las regiones Wari y Tiahuanaco y que deriva de la lengua aymara. El tinte azul oscuro que se encuentra en las flores de esta planta se ha utilizado para el teñido de las fibras naturales desde la antigüedad.

- **Propiedades medicinales**

Mantilla y Olazabal (2008) Indican que, en algunas regiones, como en Cusco utilizan el 81% de toda la planta; de esta hierba se elabora infusiones o "mates calientes" para problemas de inflamaciones renales, hepáticas, enfermedades gastrointestinales, broncopulmonares y para mejora del aprendizaje. Además, se recomienda para tratar la diarrea y la tos, dolor de muelas para lo cual las hojas deben masticarse hasta que desaparezca el dolor, así como para las aftas bucales, y fiebre (Huamantupa *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Nombre científico

*Muehlenbeckia volcánica* Bentham Endlicher (Cornejo, 1986).

### 1.1.3 Nombre común

Agapito y Sung (2005) Señalan que también comúnmente se les conoce como "Bejuquillo", "Mullak'a", "Mullaca", "Laura", "Coca-Coca"

### 1.1.4 Clasificación taxonómica:

**Reino:** Vegetal

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Caryophyllidae

**Orden:** Caryophyllales Juss. Ex Bercht y J. Presl

**Familia:** Polygonaceae Juss.

**Género:** Muehlenbeckia

**Especie:** *Muehlenbeckia volcánica* Bentham  
Endlicher.

### 1.1.5 Composición química y nutricional de Mullaca

Contiene: glucósidos cianogénéticos que incluyen la prulauracina y amigdalina, además contiene nitrilos, capulín, prumasina, taninos, saponinas, flavonoles,

flavonoides (rutina, emodina, ácido crisofánico, glicósidos antraquinónicos), ceras, lectinas, resinas, lectinas, almidones, gomas, celulosa, terpenos (Pavlow y Roersch, 1994). En la fitoquímica de la Mullaca (*Vaccinium floribundum Kunth*) tiene diversos componentes los componentes químicos y nutricionales y se clasifica como un alimento de alto valor biológico y alto contenido de antocianinas y compuestos fenólicos. Su composición química se compone principalmente de quercetina, derivados del ácido hidroxicinámico y cianidina-3-glucosido, alrededor del 67% del total de compuestos fenólicos corresponden a antocianinas 365 (mg de antocianinas/100 g de fruta fresca), de los cuales aproximadamente el 89% son derivados de antocianinas (cianidina galactósido, cianidina glucósido, cianidina arabinósido) (Mostacero *et al.*, 2015). Además identificaron, aunque en menor medida la delfinidina y dos de sus derivados: la delfinidina galactósido y la delfinidina arabinósido, así como también, como cianidina, delfinidina como agliconas (Zamora, 2009).

#### **1.1.6 Parte utilizada Mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*)**

Pavlow y Roersch (1994), son utilizadas flores, hojas, frutos y raíz.

#### **1.1.7 Pigmentos en plantas tintóreas**

Los pigmentos de las plantas vegetales a menudo se derivan de varios componentes bioactivos, que no siempre se correlacionan entre el color de la planta y los colorantes que contiene. El hecho de que una biomolécula esté teñida o no está determinado por su estructura y, en función de sus afinidades estructurales, la tinción tradicional estadounidense clasifica los tintes orgánicos en seis amplias categorías; son de interés cinco de ellos: carotenoides y flavonoides (amarillos anaranjados), antocianinas (azules y rojos), quinonas (púrpura escarlata), índigo (Cajías y Fernández, 1987).

#### **1.1.8 Polifenoles**

Los compuestos fenólicos son uno de los oligoelementos del reino vegetal y son importantes en la nutrición humana. Generalmente su clasificación incluye ácidos fenólicos, fenoles y flavonoides, que constituye un amplio grupo de sustancias químicas considerados metabolitos secundarios de los vegetales, con diferentes propiedades estructurales y químicas (Porras y López, 2009).

Tabla 1

*Compuestos polifenólicos más comunes en vegetales*

Compuestos polifenólicos	
Fenoles simples	Catecol, cardanol, cardol
Ácido hidroxibenzoico	Ácido gálico, ácido anacárdico, ácido tánico
Flavonoides	Quercitina Miriticetina
Estilbenos	Resveratrol

Fuente: (Navarro, 2018)

- **Fenoles**

Muñoz (2014) Señala que los polifenoles son importantes antioxidantes dietéticos y las papas contienen una buena parte de ellos, también promueven la salud por contener una amplia gama de propiedades. Las papas son consideradas en tercer lugar como fuente de fenoles y en segundo lugar de las manzanas y naranjas, encontrándose en la cascara y la pulpa en las papas. Actualmente, existe gran interés creciente en el consumo de papas andinas naturales pigmentadas, especialmente aquellas con pulpa roja o morada, ya que la pulpa contiene 3 a 4 veces el contenido fenólico de la mayoría de papas blancas o cremas disponibles.

Los antioxidantes vegetales son uno de los compuestos bioactivos de los alimentos y están presentes en diferentes partes de la planta, ya sean frutos, hojas, raíces y /o flores (Haytowitz y Bhagwat, 2010). El contenido total de sustancias fenólicas en algunos productos alimenticios se observa en (Tabla 2).

- **Flavonoides**

Además, son sustancias que tienen propiedades antioxidantes y por tanto favorecen la buena salud. En comparación con otros alimentos, las papas no contienen muchos flavonoides, pero su elevado consumo los convierte en una buena fuente de ellos. Al igual que los fenoles, las papas con pulpa roja o morada contienen concentraciones mucho más altas y se utilizan en la industria alimentaria como fuente de colorantes naturales y antioxidantes, especialmente como sustituto de colorantes artificiales para mejorar la salud humana (Muñoz, 2014).

Tabla 2

*Contenido total de fenoles en algunos alimentos.*

<b>Detalle</b>	<b>Contenido de polifenoles totales (mg ácido gálico/ 100 g)</b>
<b>Especies molidas</b>	
Clavo de olor	16550
Menta	491
Orégano	4980
<b>Frutas</b>	
Arándanos	311
Banana	155
Cerezas	259
Ciruelas	332
Duraznos	133
Frambuesas	414
Frutillas	332
Kiwis	211
Limoneros	51
Manzanas	250
Melones	56
Naranjas	57
Peras	178
Uvas	170
<b>Vegetales</b>	
Ajo	92
Apio	42
Berenjena	63
Brócoli	316
Cebollas	23
Coliflor	93
Papas	163
Pepino	22
Perejil	77
Pimiento rojo	255
Remolacha	188
Repollo colorado	231
Tomate	80
Zanahorias	35
<b>Legumbres</b>	
Lentejas	628
Maníes	396
Porotos	94
<b>Bebidas</b>	

Jarabe de chocolate	417
Vino blanco	20
Vino tinto Cabernet S.	203

Fuente: (Haytowitz y Bhagwat, 2010) USDA.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular con una estructura principal común de difenilpiranos (C6-C3-C6) (Figura 3), que consta de dos anillos de fenilos (A y B) unidos por un anillo de pirano C (heterocíclico) (Martínez, 2005).

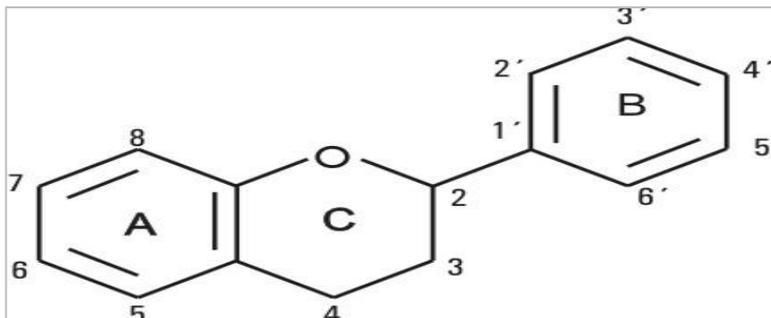


Figura 5. Estructura básica de un flavonoide

Fuente: (Martinez et al., 2005)

Los flavonoides Martinez *et al.* (2005) dependen de las propiedades estructurales. Su clasificación es de la siguiente manera:

- Los flavanos como las catequinas, tienen en la posición 3 del anillo C un grupo -OH.
- Los flavonoles, representados por la quercetina, tienen grupos carbonilo en sus moléculas, en la posición 4 y 3 del anillo C hay un grupo -OH.
- Los flavonoides, al igual que la diosmetina, carecen de un grupo hidroxilo en la posición C3 y tienen un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C.
- Las antocianinas con un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 en el anillo C y un grupo -OH adicional en la posición 3.

Las vitaminas del presente siglo, son los flavonoides, son subproductos vegetales necesarios para que tanto los humanos como los animales funcionen normalmente (Shigematsu *et al.*, 2003). Los flavonoides pertenecen a la clase de polifenoles con propiedades antioxidantes, inhiben la expresión de los inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducida (NOSi), inhiben la tirosina y serina treonina quinasa, inhiben el mecanismo del ácido araquidónico y tienen efectos antiinflamatorios, mutagénicos y anticancerígenos, pueden inhibir las vías

inflamatorias y pueden usarse para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal crónica (Somova *et al.*, 2003). Además, los fenoles inhiben la producción de óxido nítrico (ON), la 5 lipooxigenasa (5 LO) y capturan peroxinitrito. La ingesta dietética diaria estimada de flavonoides es de uno a dos gramos por día, dependiendo principalmente de los hábitos dietéticos (Gonzales *et al.*, 2011). Ingresa al cuerpo a través del tracto gastrointestinal, por lo que este órgano, especialmente el epitelio de la mucosa, está expuesto a una concentración bastante alta de flavonoides. Hoensch y Reinhard (2011), señalaron que otro desafío sería desarrollar preparados de flavonoides específicos para entregar estos compuestos a la estructura de destino y de sus receptores. Si esto se consigue, los flavonoides podrán utilizarse como agentes preventivos y terapéuticos, tal como se hacían antiguamente con las vitaminas.

- **Antocianinas**

Las antocianinas son compuestos químicos que dan a las hojas, flores y frutos sus colores rojo, azul y violeta y son particularmente importantes en los arándanos. Estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides (Kalt *et al.*, 2003). Son glucósidos de antocianidinas, es decir, que están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a las que se unen azúcares mediante enlaces O-glucosídico (Tabla 3) (Garzón, 2008). La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también conocido como 2-fenilbenzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); los dos conectados por una cadena de tres átomos de carbono (Aguilera *et al.*, 2011). Los cambios estructurales en el anillo B dan lugar a las seis antocianidinas conocidas que se ven en las figuras 6,7 y 8.

Tabla 3

*Estructura básica y sustituyente de las antocianidinas – aglicona.*

Aglicona	Sustitución		$\lambda_{max}$ (nm)
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul-rojo)

Fuente: (Garzón, 2008)

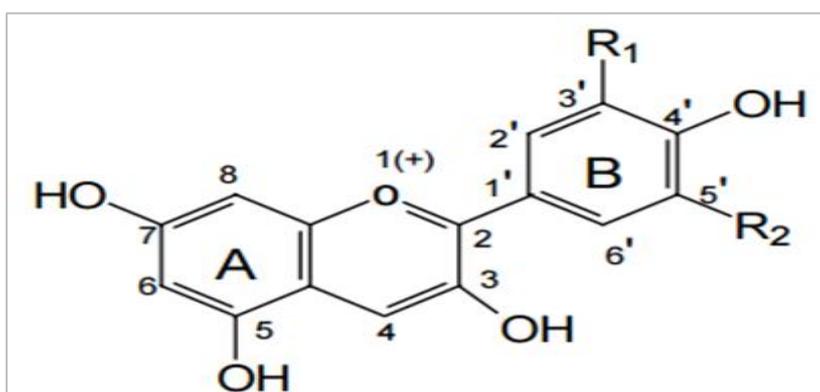


Figura 6. Estructura y sustituyentes de las antocianinas.

Fuente: (Durst y Wrolstad, 2001).

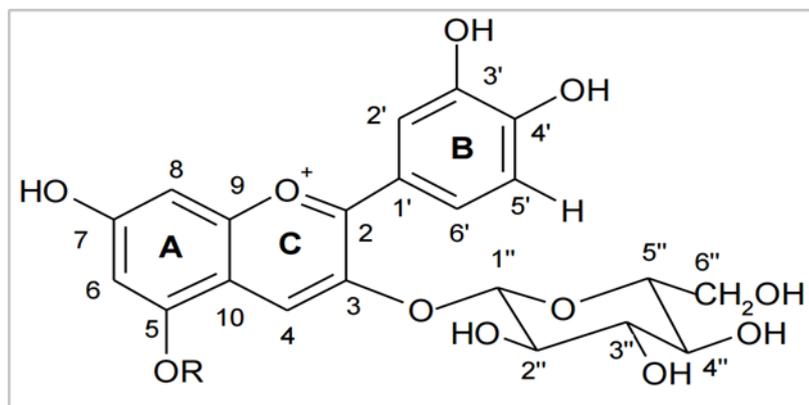


Figura 7. Estructura más común de la antociana glucosilada.

Fuente: (Walford, 1980)

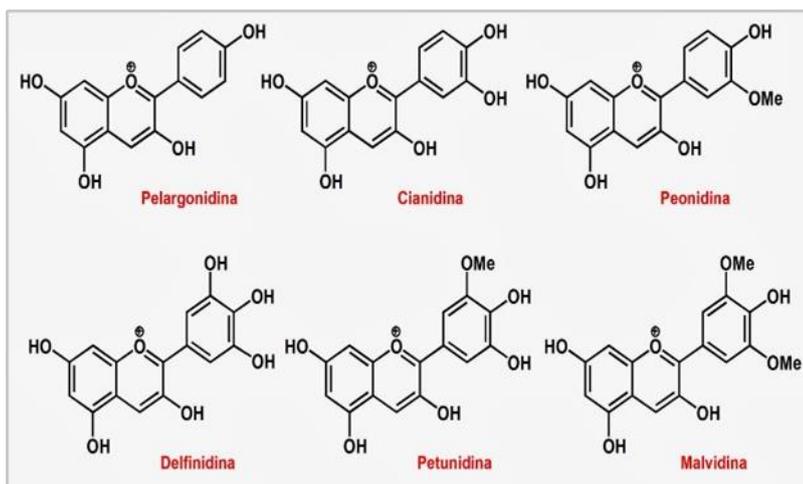


Figura 8. Estructura molecular de algunas antocianinas comunes.  
Fuente: (Walford, 1980).

La cantidad y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo dentro de la molécula de antocianina determinan el color del compuesto.

El aumento de la metoxilación produce un color rojo, mientras que el aumento de la hidroxilación produce un color azul.

Debido a la diversidad de antocianinas que se encuentran en la naturaleza, son un grupo muy complejo y fascinante con una variedad de estructuras fundamentales. Se ha informado que existen 635 antocianinas diferentes (Castañeda y Guerrero, 2015).

El número de grupos hidroxilo, el grado de metilación, el tipo, número y ubicación de las moléculas de azúcar, así como el tipo y cantidad de ácidos aromáticos y grasos unidos a los azúcares, dependen de los cambios en la composición estructural de las antocianinas (Durst y Wrolstad, 2001).

La distribución media de antocianinas en vegetales es: 30% de cianidina, 22 % delfinidina, 18 % pelargonidina, 7.5 % peonidina, 7.5 % malvidina y 5% petunidina. Los tipos de antocianinas se pueden aumentar según el tipo y la cantidad de azúcares unidos a las antocianidinas (Clifford, 2000).

Pacheco (2019) Menciona que las antocianinas son pigmentos rojos solubles en agua que se encuentran ampliamente en el reino vegetal. Las antocianidinas son agliconas con azúcares conectados por enlaces  $\beta$  – glucosídicos, y las antocianinas son glucósidos de antocianidina desde una perspectiva de composición química.

Welch *et al.* (2008), los pigmentos de las antocianinas son solubles en agua las que pertenecen a la familia de los flavonoides (compuestos fenólicos) estos son glucósidos de antocianidinas que se derivan del 2-fenilbenzopirilio (ion flavilio). Estos frutos con coloración roja, azul o morada son considerados como colorantes alimentarios y antocianinas, representando como una fuente potencial con el que se obtiene una gama de productos de consumo humano con valor agregado (Garzón, 2008).

### **1.1.9 Compuestos antioxidantes**

Al actuar como donadores de electrones (agentes reductores), los antioxidantes son moléculas que posponen o detienen la oxidación de sustratos oxidables. Los radicales libres se producen cuando un organismo quema oxígeno para obtener energía, son liberados por todos esos organismos y son fatales para la vida a menos que sean neutralizados por mecanismos de defensa celular.

Al actuar como donadores de electrones (agentes reductores), los antioxidantes son moléculas que pueden posponer o detener la oxidación de sustratos oxidables. Todos los seres vivos que queman oxígeno para obtener energía, liberan radicales libres, que son incompatibles con la vida a menos que sean neutralizados por mecanismos de defensa celular. Estos agentes protectores se llaman antioxidantes. El estrés oxidativo puede dañar o matar las células cuando los niveles de enzimas antioxidantes son bajos o están inhibidos. Su clasificación se detalla a continuación:

**Endógenos:** La catalasa, el superóxido dismutasa, el glutatión peroxidasa, el glutatión S-transferasa, la tioredoxina-reductasa y el sulfóxido-metil-tionina-reductasa son algunas de las enzimas que los organismos suelen biosintetizar.

**Exógenos:** Son fuentes dietéticas de sustancias no enzimáticas como los beta-carotenos, vitamina C y E, los fitoestrógenos, polifenoles, glutatión, ácido úrico, ubiquinol (Coenzima Q), melatonina, flavonoides y licopenos. Debido a oligoelementos como cobre, zinc, manganeso, selenio, hierro y otros minerales que son componentes esenciales de las enzimas antioxidantes centrales, el cuerpo también debe absorberlos además de las vitaminas (Porrás y López, 2009).

### 1.1.10 Capacidad antioxidante

La capacidad de una sustancia para prevenir la degradación oxidativa, como la peroxidación lipídica, se denomina "actividad antioxidante", y los efectos de los antioxidantes están determinados principalmente porque también pueden combatir los radicales libres (Londoño, 2012).

Los métodos directos e indirectos son dos categorías en las que se pueden separar los métodos para medir la actividad antioxidante. El método directo se basa en la investigación de cómo los antioxidantes afectan la degradación oxidativa del sistema, específicamente proteínas, ácidos nucleicos, plasma, grasas, lipoproteínas, biopelículas, etc. El uso de radicales libres metaestables coloreados con una potente absorción espectro visible, como DPPH y ABTS, es una forma común de medir la actividad estabilizadora de los radicales libres de los antioxidantes y, por lo tanto, estudiar indirectamente su capacidad para estabilizar radicales libres particulares (Londoño, 2012). Se muestra una excelente estabilidad durante la reacción mediante los métodos ABTS y DPPH (Kuskoski *et al.*, 2005).

### 1.1.11 Extracción de antocianinas

En la actualidad existe la necesidad de desarrollar métodos eficaces para obtener por extracción sustancias activas útiles a partir de materiales vegetales, la misma que continúa creciendo. Muchos parámetros tienen efectos en el proceso de extracción de antocianinas. El pH, la temperatura, el tiempo de extracción y la composición del disolvente son algunos de ellos (Borges *et al.*, 2011). Para extraer antocianinas se puede utilizar alcohol acidificado, agua o una mezcla con una pequeña cantidad de ácido añadido para evitar la degradación del material.

### 1.1.12 Factores que influyen en la extracción

#### a) Solvente

Alta selectividad, baja viscosidad y libre circulación son requisitos para el solvente elegido (Ibarz, 2005); pero a medida que avanza la extracción, la concentración del soluto aumenta y el gradiente de concentración cae a medida que aumenta la viscosidad (Ullauri, 2010).

El agua se considera un solvente universal debido a su capacidad de extracción tanto en fase sólida como líquida, mientras que el etanol se usa frecuentemente para extraer componentes activos de las plantas (Ullauri, 2010).

#### **b) Tamaño de partícula**

Debido a que las partículas sólidas más pequeñas tienen más superficie en contacto con el líquido y una distancia de difusión más corta entre soluto y el disolvente, la cantidad de soluto transferida se ve afectada de manera diferente por el tamaño de la partícula (Ullauri, 2010).

El tamaño de las partículas tiene un impacto diferente en la extracción porque los sólidos pequeños tienen una mayor superficie de contacto con el líquido, la distancia de difusión el soluto -disolvente más corta y una mayor tasa de transferencia de soluto) (Ullauri, 2010).

#### **c) Tiempo de extracción**

En la extracción de colorante se piensa que es un factor de menor incidencia, pero a nivel industrial en producción de alto volumen se convertirá en un factor de costos operativos muy significativo ya que la rentabilidad disminuye con tiempos de producción más largos (Centeno, 2003).

### **1.1.13 Estabilidad de antocianinas**

El color y la tonalidad de las antocianinas están determinados por el número y orientación de sus grupos hidroxilo y metoxilo en la molécula; a medida que aumenta la hidroxilación se produce azul, mientras que aumenta la metoxilación se produce rojo (Zapata, 2014). La baja estabilidad de las antocianinas durante el procesamiento y almacenamiento limita su uso en matrices alimentarias, farmacéuticas y cosméticas a pesar de sus beneficios como posible reemplazo de colorantes artificiales (Garzón, 2008; Wrolstad, 2000). Algunos factores que afectan la estabilidad del pigmento incluyen la concentración y actividad de agua de la matriz, la presencia de oxígeno, ácido ascórbico, el pH y la temperatura.

#### **1.1.14 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas**

Muchos factores influyen en la estabilidad de las antocianinas. Los procedimientos técnicos, como la extracción de antocianinas del material vegetal, el tratamiento térmico o el almacenamiento de productos que los contienen, pueden tener un impacto en su integridad estructural (Zapata, 2014).

Según Peguero (2007) las antocianinas son extremadamente inestables porque en solución se ven dañadas por la luz, los cambios de pH, la temperatura, la oxidación, la presencia de otros flavonoides y metales. La deficiencia de electrones en el núcleo flavilio las antocianidinas experimenten con frecuencia reacciones que alteran su estructura. Dependiendo de cuántos grupos metoxilos estén presentes en el anillo B y de cuántos grupos hidroxilo estén presentes en la molécula, la estabilidad de la molécula aumentará o disminuirá.

##### **a) Efecto del pH**

La forma más estable de las antocianinas carece del núcleo flavilio y es muy sensible a los cambios de pH (Wong, 1994) dado que el color de estos pigmentos depende de cuán ácido o alcalino sea el sistema en el que se usan, sirven como verdaderos indicadores de pH. Debido a esto, sólo los alimentos que son ácidos y tienen un pH inferior a 3.5 pueden utilizar eficazmente estos pigmentos antocianicos como colorantes naturales (Castañeda *et al.*, 2009; Zapata, 2014 y Barragán, 2018).

La estructura de las antocianinas está protegida por la acidez y, a medida que aumenta el pH, la estructura inestable se degrada más rápidamente. Para que predominen los cationes flavilio, se aconseja el uso de antocianinas en los sistemas alimentarios para alimentos con acidez intermedia (Aguilera, 2011).

##### **b) Efecto del oxígeno**

Las antocianinas se pueden oxidar para producir color marrón o incoloro mediante una reacción directa con oxígeno o una reacción indirecta con compuestos previamente oxidados. Como antioxidantes, también pueden interactuar con los radicales libres de oxígeno. Estos procesos de oxidación se activan a medida que aumenta la temperatura (Barragán, 2018).

También se observó la formación de peróxido de hidrógeno, ésteres incoloros y derivados del compuesto cumarina a partir de la reacción del ácido ascórbico y antocianinas en presencia de oxígeno. El cobre sirve como catalizador para esta reacción y los flavonoles sirven como inhibidores (Fennema, 2010).

Según Garzón (2008) el efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas se puede atribuir a una reacción de condensación entre el ácido y el pigmento. Para eliminar el oxígeno, técnicas como el envasado al vacío muestran una dispersión de color (Fennema, 2010).

### **c) Efecto de la luz**

La degradación de las antocianinas se acelera con la luz, que también es necesaria para la biosíntesis de antocianinas. Conservan mejor su color si se almacenan en la oscuridad. La mayor pérdida de antocianinas (70%) se observó bajo luz fluorescente y una temperatura ligeramente elevada (Markakis, 1982; Barragán, 2018 y Pacheco, 2019). Tanto el vino tinto como otros zumos de frutas sufren los efectos negativos de la luz, que puede acelerar la degradación de las antocianinas. Los antioxidantes sulfonatos de las flavonas polihidroxiladas, las isoflavonas y auronas protegen contra la fotodegradación (Fennema, 2010).

### **a) Efecto de la temperatura**

La temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en cómo se descomponen las antocianinas. Las investigaciones muestran que estos pigmentos se degradan fácilmente cuando se exponen al calor y el aumento de la temperatura aumenta la tasa de degradación. En comparación con las antocianinas metiladas, glicosiladas o acetiladas, las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente (Garzón, 2008). Para aumentar la estabilidad del pigmento, se recomienda un breve tratamiento a alta temperatura por corto tiempo seguido de un almacenamiento a baja temperatura (Medina, 2012). Asu vez Castañeda y Guerrero (2015), demostraron que se pueden utilizar dos mecanismos diferentes (hidrólisis de enlaces glicosídicos, que da como resultado la formación de agliconas, o por ruptura hidrolítica, que da como resultado la formación de chalconas) para explicar cómo las antocianinas se degradan cuando aumentan las temperaturas.

## **b) Efecto de las enzimas**

Las glicosidasas y las polifenoloxidasas, también conocidas en conjunto como antocianasas, son dos grupos de enzimas que intervienen en la decoloración de las antocianinas. Las glicosidasas hidrolizan los enlaces glucosídicos, formando azúcar o azúcares y agliconas. La disminución de la solubilidad de las antocianinas y su transformación en productos incoloros son los culpables de la pérdida de intensidad del color. En presencia de O-difenoles, la polifenoloxidasa produce O-benzoquinonas, que luego interactúan con las antocianinas a través de medios no enzimáticos para producir antocianinas oxidadas y productos de degradación (Fenema, 2010).

### **1.1.15. Metodología de superficie de respuesta (MSR)**

Es una combinación de análisis de regresión y diseño experimental que Box y Wilson propusieron en 1951. El mejor valor de variable independiente es aquel que maximiza, minimiza o satisface un conjunto de restricciones sobre la variable de respuesta de posición. Esto se determina mediante una serie de experimentos y técnicas de modelado (Jimenez, 2015).

#### **a) Aspectos de metodología de superficie de respuesta**

Los métodos de superficie de respuesta incluyen tres aspectos: diseño, modelos y técnicas de optimización (Gutiérrez y Vela, 2008).

- Aspecto del diseño: Esto indica que se debe utilizar un diseño experimental para optimizar el procedimiento, particularmente para ajustar modelos de regresión lineal múltiple. Este estudio utilizó un diseño de “Diseño Central Compuesto Rotable (DCCR)”.
- Aspectos de modelo: Los siguientes son los componentes básicos de un análisis de regresión lineal múltiple: parámetros del modelo, modelo ajustado, significancia del modelo, prueba de falta de ajuste, residuos, variables predictivas, intervalo de confianza de predicción y coeficiente de determinación.
- Los modelos utilizados en MSR son polinomios básicamente. Así, si hay  $k$  factores, el modelo de primer orden se obtiene de la siguiente manera:

$$Y = \beta^{\circ} + \sum \beta_i X_i \quad k \quad i = 1 + \varepsilon$$

Y el modelo de segundo orden es:

$$Y = \beta^{\circ} + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \varepsilon \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

Y: Variable de respuesta

X<sub>1</sub>: Variable independiente 1

X<sub>2</sub>: Variable independiente 2

X<sub>3</sub>: Variable independiente 3

β<sub>0</sub>: Intercepto

β<sub>1</sub>; β<sub>2</sub>; β<sub>3</sub>; β<sub>11</sub>; β<sub>12</sub>; β<sub>22</sub>; β<sub>33</sub>: Coeficientes de regresión

Teniendo en cuenta dos variables de proceso, X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub>, así como varios valores de parámetro, Figura 9 muestra un diagrama del modelo producido por las ecuaciones de primer y segundo orden. La Figura a muestra el modelo de primer orden, que es claramente un plano según su superficie. En las Figuras b, c y d se muestran diferentes modelos de segundo orden. El signo y la magnitud de los coeficientes del modelo determinan la forma precisa de la superficie. Las tres formas básicas representadas por estos gráficos son: b superficie máxima (montaña), c superficie mínima (valle) y d superficie de punto silla (mínimax).

- Aspectos de optimización: Consiste en técnicas matemáticas que, dado un modelo conocido, se aplican para analizarlo con el fin de conocer más sobre el punto óptimo.

## b) Técnicas de optimización

Una vez que el modelo se ha ajustado y validado correctamente, se examina la superficie que describe para identificar el conjunto de niveles de factores que ofrece el mejor valor de respuesta o para determinar la óptima dirección de respuesta. Los experimentos futuros son posibles. Si el modelo no puede explicar al menos el 70% del comportamiento de respuesta (en términos de R<sup>2</sup>), no se recomienda para fines de optimización debido a su mala calidad predictiva (Gutiérrez y Vela, 2008).

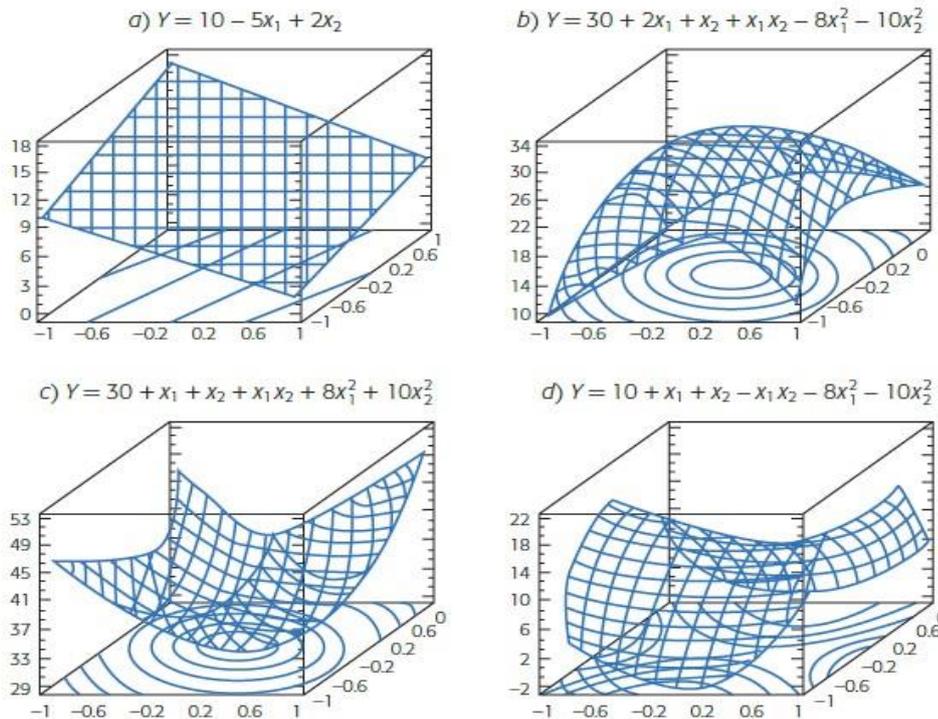


Figura 9. Superficies de respuesta: a) descrita por un modelo de primer orden; b), c) y d) descritas por modelos de segundo orden.

### c) Mejor tratamiento y punto óptimo

La mejor combinación de niveles de factor dados los niveles utilizados durante el estudio experimental es el tratamiento óptimo. El punto óptimo es la mejor combinación de valores de los factores en estudio, teniendo en cuenta toda la región de operabilidad. En particular, en un diseño factorial completo, el mejor tratamiento entre todos los tratamientos probados en el estudio es el "tratamiento ganador" desde un punto de vista estadístico. En cambio, el punto óptimo significa que es la mejor combinación posible en toda la región de operabilidad. Por lo tanto, determinar el punto óptimo plantea un desafío mayor para el experimentador y requiere de una estrategia más completa que permite la ejecución secuencial de múltiples experimentos y el uso de técnicas analíticas adicionales (Gutiérrez y Vela, 2008).

### d) Diseño central compuesto (DCC)

Se trata de diseños factoriales con las  $2k$  combinaciones adicionales se dividen en "n puntos centrales" y "puntos axiales". Las coordenadas de los puntos de los axiales para cada eje del factor de codificación son:  $(\pm\alpha, 0, 0, \dots, 0)$ ;  $(0, \pm\alpha, 0, \dots, 0)$ ;  $(0, 0, 0, \dots, \pm\alpha)$ , los puntos centrales tienen la forma  $(0, 0, 0, \dots, 0)$ . Dependiendo de la

elección del punto axial  $\alpha$ , el diseño central compuestos pueden tener diferentes propiedades como ortogonalidad, rotabilidad y homogeneidad (Gutiérrez y Vela, 2008). La varianza de la estimación debe ser constante en puntos que estén equidistantes del centro de la estructura, que es la única propiedad ideal que estos diseños tienen en cuenta. Esta propiedad, llamada rotabilidad, se obtiene estableciendo  $\alpha = (2k)^{1/4}$ . Como resultado, los valores  $\alpha$  para el constructo de dos factores y el constructo de tres factores son respectivamente 1,414 y 1.682.

Un potente método estadístico que se emplea con frecuencia para optimizar procesos complejos es el método de superficie de respuesta (MSR) (Xu *et al.*, 2018). El principal beneficio de MSR es que minimiza el número de pruebas experimentales necesarias para evaluar diferentes parámetros y sus interacciones, así como para producir modelos matemáticos para establecer valores óptimos (Kan *et al.*, 2015). La extracción de proteínas, polisacáridos, flavonoides, compuestos fenólicos y otros compuestos de una variedad de materiales se ha optimizado utilizando esta técnica.

## 1.2 Antecedentes

En la literatura científica se encontraron investigaciones sobre caracterización, cuantificación y determinación de la capacidad antioxidante en extractos de frutos de (*Muehlenbeckia volcánica*) los cromatogramas de HPLC pertenecen a antocianidinas, delfinidina y petunidina cuyo contenido de polifenol total 275,55 (mg de ácido gálico/100g), antocianina 171.85 (mg cianidina-3- glucósido/100g) y capacidad antioxidante TEAC DPPH 31,37 ( $\mu\text{mol trolox/g}$ ), determinando que estos frutos pueden ser utilizados como alimentos funcionales y tienen altas capacidades antioxidantes (Barragan *et al.*, 2020). Sin embargo, no se ha optimizado el proceso de extracción para determinar el contenido total de antocianinas y tampoco la cuantificación en porcentaje de las antocianidinas, delfinidinas y petunidinas en los cromatogramas de HPLC. Según Chacón y Octavio (2015), el Perú es un país rico en biodiversidad con una gran variedad de frutos que han recibido poca investigación como son los frutos de mullaca, todavía se comen como frutos silvestres. Asimismo hoy debido a la gran demanda de alimentos funcionales es primordial investigar los componentes bioactivos y determinar los parámetros para la extracción de colorantes naturales con el fin de incrementar el uso de colorantes naturales en alimentos que tengan propiedades antioxidantes, lo que beneficiará a la población de la región andina (Pokorny *et al.*, 2005).

Giusti y Wrolstad (2001) En su estudio menciona que para un total de 63 tratamientos se utilizó un diseño experimental mixto ( $7 \times 3 \times 3$ ). Incluía tres factores: tiempo (7 niveles) (0,5,10,15,20,25 y 30 días) y (3 niveles) temperatura (0, 10 y 20°C) y pH (3, 4 y 5). Cálculo del rendimiento del zumo de fruto tras la extracción de antocianinas del fruto de zarzamora. Durante 30 días, se tomaron lecturas de absorbancia (nm) utilizando un espectrofotómetro UV-Vis cada cinco días, estos datos se utilizaron para evaluar cómo eran las influencias de los factores relacionados con la estabilidad. Luego utilizaron el método de pH diferencial (método propuesto) para calcular las antocianinas totales. Cuando se evalúa la estabilidad de las antocianinas en los frutos de zarzamora, se descubre que el rendimiento de extracción en el zumo es del 62,89%. Luego de la evaluación, se encontró que los factores de tiempo y temperatura no afectan la estabilidad de las antocianinas en frutos de zarzamora, por lo que se concluyó que no tienen efecto sobre la estabilidad de las antocianinas. Las antocianinas se degradan menos a temperaturas más bajas y más a temperaturas más altas, después de analizar los resultados de concentración (antocianinas totales), finalmente calculamos la energía de activación en varios niveles de pH: pH 3,  $E_a = 16,99$  kJ/mol; pH 4,  $E_a = 51,48$  kJ/mol y pH 5,  $E_a = 13,77$  kJ/mol en extracto de zarzamora (Pacheco, 2016).

Se optimizó el proceso de extracción de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) y se evaluó su capacidad antioxidante mediante un estudio efectuado, teniendo como objetivo de la investigación realizar análisis fisicoquímicos, contenido en fenoles y antocianinas en extractos de la piel y pulpa. El procedimiento de extracción de antocianinas se optimizó utilizando la metodología de superficie de respuesta teniendo en cuenta tres variables: concentración de solvente, etanol acidificado 1% con ácido ortofosfórico (50–90% v/v), temperatura de extracción (30–60 °C) y tiempo de extracción (4 a 12) horas. La capacidad antioxidante se evaluó mediante el método ABTS (6-sulfonil-3-etilbenzotiazolona). Aunque la capacidad antioxidante mostró un comportamiento lineal, la extracción de antocianinas de la cáscara siguió un modelo cuadrático. Las condiciones de extracción con un solvente acidificado al 50%, un período de extracción de 4 horas y una temperatura de 30 °C tuvieron el mayor contenido de antocianinas, alcanzando 62 mg/100 g, según la optimización del modelo (Heras *et al.*, 2013).

Torres y Cobo (2014) Estudiaron la extracción de pigmentos de mortiño y evaluaron su estabilidad como colorantes en la industria alimentaria mediante extracción sólido-líquido con etanol de 96° como solvente y ácido cítrico p/v 0,03% de concentración; para

evaluar la estabilidad del pigmento de mortiño (*Vaccinium meridionale*), utilizado como colorante en la industria alimentaria, los investigadores analizaron su estabilidad según los siguientes factores: temperatura (4, 14 y 68 °C), pH (4, 5 y 6), ambiente de almacenamiento (luz, oscuridad) por cuatro semanas. Los resultados mostraron que estos factores tuvieron un efecto significativo sobre los pigmentos, la degradación de las antocianinas aumentó con la temperatura y permaneció estable a bajas temperaturas, mientras que el pH tuvo el efecto opuesto y fue más estable a un pH más bajo, un pH más alto provocará un cambio de color, es decir, cambiará de color cuando se exponga a altas temperaturas. La luz afecta la estabilidad y es más estable en condiciones de oscuridad.

Se han efectuado trabajos de investigación de extracción de antocianinas en arándanos, encontrando sus parámetros óptimos a 50°C de temperatura a pH 1.2 en una hora de extracción y cuando la proporción de materia prima disolvente es (1:2,8) kg/kg, el contenido de antocianina es relativamente alto, con 879,0 mg cianidina -3-glucósido/100 mL, el contenido total de fenoles es 1424 mg GAE/100 mL y las actividades antioxidantes se estimaron mediante los métodos ABTS y DPPH en 5730 y 4872 mg EAA/100 mL, respectivamente (Zapata *et al.*, 2014).

Según investigaciones sobre la extracción de antocianinas del maíz morado determinaron los factores y cómo interactuaron entre sí demostraron que al extraer las antocianinas de las coronas de maíz morado dependía del tiempo y la temperatura de extracción, y que un 20% de etanol y un rango de pH de 2 a 4 eran favorables para la extracción, arrojando un valor de 46.534 mg de antocianinas/g de muestra (Gorriti *et al.*, 2009).

Hector *et al.* (2006) Se encuentra una fuerte capacidad antioxidante y efectos bioactivos en frutas con alto contenido de flavonoides y polifenoles, los extractos del fruto de Mullaca también pasaron por la misma evaluación.

Los frutos de arándanos o blueberry (*Vaccinium corymbosum*) son los más comunes y reconocidos por su alto contenido antioxidante y valor comercial (Ribera *et al.*, 2010). Para evaluar la capacidad antioxidante de estos extractos naturales para su potencial uso como fuente natural de antioxidantes, también se estudió la degradación de compuestos bioactivos en tubérculos como la papa coloreada (Barragán y Aro, 2017).

Mellado *et al.* (2012) En la investigación sobre mullaca (*Muehlenbeckia hastulata*) hallaron que las raíces contienen antraquinonas como ácido crisofánico, emodina, rhein,

pseudohipericina, y en las partes aéreas contienen taninos y flavonoides (rutina y epicatequina) (Mellado *et al.*, 2013; Arauco, 2016), examinaron las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* y aislaron tres antraquinonas del extracto de acetato de etilo (EtOAc). El material vegetal se secó al aire, se extrajo dos veces con 2 litros de EtOAc y se agitó cada 24 horas para probar la actividad blanqueadora de estos compuestos. Se produjo un residuo que pesaba 56,27 g después de que el extracto resultante se concentrara al vacío. Para aislar las tres antraquinonas, el extracto se cargó en gel de sílice (malla 0,063-0,200) y se fraccionó en una columna ultrarrápida usando un gradiente de hexano-EtOAc (0 a 100 %). Concluyendo que *Muehlenbeckia vulcanica* Meisn contiene antraquinona-O-glucósido, mientras que *Muehlenbeckia hastulata* contiene emodina y rhein.

Erazo *et al.* (2002); Arauco (2016) Descubrieron flavonoides, epicatequina, rutina y emodina 8-glucósido después de analizar la composición química y la actividad farmacológica de las raíces y partes aéreas de la planta. Demostraron que los derivados de antraquinona están presentes en el género *Muehlenbeckia* y, como resultado, *Muehlenbeckia vulcanica* Meisn contiene antraquinona-O-glucósido y *Muehlenbeckia vulcanica* Bentham contiene saponinas, taninos, rutina, resinas y compuestos antraquinónicos: ácido crisofánico y su glucósido emodina y su glucósido y Rhein (Rodríguez *et al.*, 2002; Arauco, 2016).

Tao *et al.* (2015) Desarrollaron y optimizaron un método de extracción ultrasónica (EUAE) altamente eficiente para la extracción de polisacáridos de *Momordica charabtia* L. Se utilizan un experimento de un factor y un experimento ortogonal para los principales factores experimentales y su rango de detección. Con base en resultados experimentales preliminares, se utilizaron la metodología de superficie de respuesta (RSM) y el diseño Box-Behnken (BBD) para optimizar las condiciones de EUAE. Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación polinómica de segundo orden mediante análisis de regresión múltiple y análisis de varianza (ANOVA) y luego se utilizaron para crear un modelo matemático para la optimización experimental. Las condiciones óptimas de extracción fueron: pH 4,38, temperatura de extracción 52,02 °C, tiempo de extracción 36,87 min. El polisacárido (MCP) de *Momordica charabtia* L. cuyo rendimiento es de  $29,75 \pm 0,48$  % en condiciones de extracción ideales, lo que estaba en línea con el valor previsto del modelo BBD de 29,80 %.

Las fresas son una fruta importante para hacer jugo porque contienen compuestos bioactivos que promueven la salud. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ultrasonido (0, 4, 8, 12 y 16 min) sobre el color, el ácido ascórbico, los compuestos fenólicos y el perfil de actividad antioxidante del jugo de fresa. También se evaluaron las propiedades microestructurales de las fresas tratadas con ultrasonido. Los resultados mostraron que 16 minutos de ultrasonido aumentaron significativamente la diferencia de color en las muestras ( $p < 0,05$ ). Entre ellos, los contenidos de fenólicos totales, flavonoides, ácido ascórbico y actividad antioxidante fueron mayores en las muestras tratadas con ultrasonido durante 12 minutos. El análisis microestructural reveló la formación de formas irregulares, desgarros y pérdidas de tejido y distorsión de las paredes celulares, lo que explica por qué el ultrasonido mejora la eficiencia de extracción de fitoquímicos. Los resultados actuales presentados en este estudio proporcionan una mejor comprensión del uso del ultrasonido para mejorar los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del jugo de fresa (Wang *et al.*, 2019).

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 2.1 Identificación del problema

El clima y la ubicación geográfica del Perú en relación con los principales mercados mundiales son dos factores clave para que la agricultura peruana sea competitiva en un entorno internacional. En el Perú se pueden encontrar hasta 84 de los 108 tipos de clima que se encuentran en el mundo, lo que permite que la agricultura proporcione variedad de cultivos, diversidad de cultivos y especies forestales (MINAGRI, 2017). El modo de vida que llevamos actualmente promueve patrones alimentarios poco saludables y el consumo de alimentos con escaso valor nutricional y capacidad antioxidante. Desafortunadamente, consumimos menos alimentos naturales debido al énfasis de nuestra dieta en la comida rápida rica en grasas, la comida chatarra, los alimentos enlatados con conservantes y las bebidas con alto contenido de azúcar (como los refrescos). Como resultado, ahora existen importantes problemas de salud en nuestra sociedad, incluido un aumento de las enfermedades crónicas y la desnutrición, la obesidad y varios tipos de diabetes.

Es necesario consumir alimentos con actividad biológica natural, como frutas regionales o nativas y granos andinos, porque la mayoría de los alimentos procesados comercialmente contienen antioxidantes sintéticos, muchos de los cuales contienen sustancias nocivas no saludables y contribuyen a una serie de enfermedades.

Cuando se consumen alimentos con contenido de compuestos fenólicos y antocianinas, pigmentos que dan colores violeta, rojo y azul, estos compuestos bioactivos y tienen la capacidad de afectar las actividades celulares y fisiológicas, son beneficiosos para la salud. Se ha demostrado en numerosos estudios que las antocianinas tienen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacterianas, antidiabéticas y antiinflamatorias (Aguilera *et al.*, 2011).

*Muehlembeckia volcánica* se encuentra actualmente en Perú como un arbusto silvestre, a menudo utilizado como material para cercas en propiedades rurales, y sus frutos maduros rara vez se utilizan como alimento, ya que generalmente se cosechan entre marzo y junio. Arbusto de distribución limitada. Pero como es común en las regiones de Apurímac, Huancavelica y Cusco, aún no se ha establecido su verdadero valor agregado, se considera que es una sustancia con un alto potencial bioactivo que puede utilizarse para obtener colorantes naturales.

El problema de este trabajo de investigación es que la extracción del contenido total de antocianinas no se ha optimizado aplicando la metodología de superficie de respuesta y la falta de evaluación de compuestos bioactivos específicamente de antocianinas de los frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*) referente a la cuantificación de los cromatogramas de HPLC en porcentaje de la antocianidina, delfinidina y petunidina.

Por todo ello se plantean las siguientes interrogantes:

## 2.2 Enunciados del problema

### 2.2.1 Problema general

¿Cuál será el resultado de la optimización del proceso de extracción de antocianinas totales y de la evaluación de compuestos bioactivos en fruto de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*)?

### 2.2.2 Problema específico

- ¿Cuál es la extracción óptima de temperatura, pH y tiempo de antocianinas totales en frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*)?
- ¿Cuál es el efecto de la temperatura, pH y tiempo de extracción optimizada en el contenido de antocianina total en fruto de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*)?
- ¿Cuáles son los compuestos bioactivos en los frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*)?

## 2.3 Justificación

Gracias a su segundo bosque más grande de América Latina, que permite la producción de una variedad de alimentos, medicinas e incluso productos industriales, Perú tiene el privilegio de ser un país megadiverso. Perú también ha podido consolidarse como uno de

los productores de frutas más importantes del mundo gracias a la alta demanda de bienes naturales como las frutas. Para aprovechar los beneficios nutricionales de este grupo de alimentos (frutas, cáscaras y semillas) se están planteando nuevas alternativas, debido a que el consumo de frutas en nuestro país es bajo.

Los compuestos bioactivos, también conocidos como fitoquímicos, son sustancias químicas que tienen efectos farmacológicos, regulan procesos corporales específicos del individuo, mejoran la salud y el bienestar o reducen el riesgo de enfermedades, estos componentes suelen estar presentes en pequeñas cantidades en los productos de origen vegetal.

Los componentes bioactivos de este fruto se han caracterizado en alguna investigación hasta el momento, mas no la optimización de la extracción de antocianinas totales, si bien se han estudiado procesos de optimización ha sido en otros vegetales como la berenjena mas no en frutos de mullaca. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación optimizó la extracción de antocianinas totales, así como la identificación, cuantificación, contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*),

Es por ello en el presente trabajo de investigación se efectuó la optimización del proceso de extracción de antocianinas totales e identifico, cuantifico las antocianidinas, los polifenoles totales y su capacidad antioxidante en frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*), la presente investigación está plenamente justificada por el uso del mismo en la industria alimentaria y textil, los cuales pueden actuar impidiendo, interrumpiendo o reparando el daño causado por los radicales libres en el organismo,

## 2.4 Objetivos

### 2.4.1 Objetivo general

- Optimizar el proceso de extracción de antocianinas totales y evaluar los compuestos bioactivos en frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*).

### 2.4.2 Objetivo específico

- Optimizar el proceso de extracción (temperatura, pH y tiempo) de antocianinas totales en frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*).

- Evaluar el efecto de la temperatura, pH y tiempo de extracción optimizada en el contenido de antocianinas totales en fruto de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*).
- Evaluar el contenido de antocianinas y antocianidinas por cromatografía líquida HPLC y determinar compuestos bioactivos en frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*).

## 2.5. Hipótesis

### 2.5.1 Hipótesis general

- Los frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*) incrementan el contenido de antocianinas totales al optimizar el proceso de extracción y contienen compuestos bioactivos.

### 2.5.2 Hipótesis específicas

- Los frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*) incrementan el contenido de antocianinas totales al optimizar el proceso de extracción.
- Temperatura, pH y tiempo, tienen efecto en el contenido de antocianinas totales en frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*) al optimizar el proceso de extracción.
- Los frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*) contienen compuestos bioactivos.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de estudio

Esta investigación se realizó en la provincia de Abancay-Apurímac, entre las coordenadas geográficas ubicado en la latitud  $-13.63389$  y longitud  $-72.88139$ . Forma parte del continente sudamericano y está ubicado en el hemisferio sur entre  $13^{\circ}38'2''$  latitud sur y  $72^{\circ}52.883'$  latitud oeste del meridiano de Greenwich a 2,377 m.s.n.m. La parte experimental se llevó a cabo en las siguientes instalaciones:

- Laboratorio de química (ensayos) y evaluación sensorial-control de calidad, de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Nacional Micaela Bastidas-Apurímac, sito en el Campus Universitario de la ciudad de Abancay.
- Laboratorio de servicio UNSAAC – Cusco.

#### 3.2 Población

Para realizar las pruebas experimentales del presente estudio se utilizó como materia prima a partir de los frutos cosechados de la planta de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*) procedente de la región de Apurímac -Perú, provincia de Abancay, distrito de Circa en junio de 2018.

#### 3.3 Muestra

Según su nivel de madurez, se tomaron muestras de racimos de frutos de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*), seleccionándose principalmente los frutos de color rojo purpura por su mayor contenido de compuestos fenólicos y antocianinas ya que dependiendo del nivel de madurez, disminuye la acidez, aumenta la cantidad de sólidos totales y azúcares.

Se determino el tamaño de la muestra por muestra puntual intencional que se realizó directamente recolectando los frutos de aproximadamente 5 kg (Fig. 10 y 11) en la respectiva zona antes indicada y el análisis se realizó en una sola variedad por lo que se considera población uniforme.

Las muestras obtenidas fueron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



*Figura 10.* Frutos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*).



*Figura 11.* Frutos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*).

### 3.4 Métodos

El tipo de investigación es tanto experimental como aplicada debido a que contribuye a la optimización del proceso de extracción de antocianinas totales (CAT), teniendo como variables independientes la (temperatura, pH y tiempo) para su evaluación y se prosigue con la cuantificación de antocianinas totales, perfil de antocianinas e identificación de compuestos bioactivos en fruto de mullaca congelado. El método es tanto inductivo como deductivo, tanto de naturaleza experimental como cuantitativo. En la presente

investigación, la unidad de análisis fue el fruto congelado (extracto) de mullaca (*Muehlebeckia volcánica*).

### 3.5 Descripción detallada de métodos por objetivos específicos

#### a) Descripción de variables analizadas en los objetivos específicos

El diseño experimental con variables y niveles desarrollado en la investigación se detallan en la Tabla 4, en ella se representa la relación entre variables independientes, en esta tabla las variables independientes son la temperatura (20 y 60 °C), pH (3 y 4) y el tiempo (180 y 300 min.), estas variables también se denominan variables de entrada, al igual que variables independientes o variables de salida, que son las variaciones o modificaciones que ha sufrido o ha sufrido la sustancia biológicamente activa (compuestos bioactivos) en estudio. Utilizando este protocolo, se analizaron los cambios en el contenido total de antocianinas de acuerdo con la optimización de la extracción; se evaluaron (antocianinas totales respecto a la identificación y cuantificación por el método HPLC, polifenoles totales y capacidad antioxidante) al tratamiento óptimo.

#### 3.5.1 Factores de estudio

- **Variables independientes**

Optimización de la extracción (T°, pH y Tiempo) en el contenido de antocianinas totales.

- **Variable dependiente**

Contenido de antocianinas totales (pH diferencial y HPLC).

Compuestos bioactivos (polifenoles totales y capacidad antioxidante)

El diseño experimental con variables y niveles se muestra a continuación:

Tabla 4

*Diseño experimental con variables y niveles*

Variables	Nombre de variables	Niveles
	Temperatura (T en °C)	6.36414 a 73.6359
Variables independientes	pH	2.6591 a 4.3409
	Tiempo (t en min)	139.092 a 340.908
Variable dependiente	Contenido de antocianinas totales en (mg cianidina-3-glucósido/100g)	CAT Componentes bioactivos: - Cromatografía líquida HPLC (Antocianinas y antocianidinas) - Actividad antioxidante - Polifenoles totales

**a. Descripción detallada del uso de materiales y equipos, instrumentos e insumos**

• **Materiales y equipos**

Para toda la investigación se utilizarán los siguientes equipos y materiales:

- Espectrofotómetro UV- Vis Genesys 180 Thermo Scientifics que mide a 520 y a 700 nm.
- Refrigerador para almacenamiento de productos químicos, Whirlpool (Benton Harbor, Michigan).
- Balanza analítica Ohaus, Adventure (Parsippany, New Jersey).
- Termostático Memmert GmbH & Co (Schwabach, Alemania).
- HPLC analítica Agilent 1200 con inyección manual y automática, detector de masas de cuadrupolo simple acoplado, detector de matriz de diodos y detector de índice de refracción en series (Santa Clara, California).
- Rotavapor Buchi R-215, (Flawil, Suiza)
- Centrífuga, Centurion Scientific C 2006
- Vortex, Scilogex compact MX-F.
- Termómetro digital infrarrojo sin contacto, serie GM 300 (-32 a 350°C).

- Micropipetas de la marca BOECO, volúmen 0,1-10  $\mu$ l; 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l (Hamburgo, Alemania).

- **Reactivos**

- Solventes de extracción, acetona, cloroformo, metanol (reactivos analíticos Fermont, distrito Federal de México).
- Solventes de grado analítico para cromatografía en columna y pruebas de antioxidantes: metanol, etanol absoluto, isopropanol, acetato de etilo (Sigma-Aldrich, Saint, Louis, Missouri)
- Ácido gálico para síntesis.
- Reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu
- Metanol p.a. ACS.ISO. Reag. pH Eur
- Peroxodisulfato de potasio p.a. Alias: potasio de persulfato (Merck, Darmstadt, Alemania).

- **Metodología**

Para la optimización del proceso de extracción de antocianinas totales y la determinación de compuestos bioactivos (polifenoles totales y capacidad antioxidante) de la mullaca se muestra el diagrama de flujo para la extracción de antocianinas utilizando la metodología de superficie de respuesta y la evaluación de compuestos bioactivos mediante el método de HPLC, DPPH y polifenoles totales (Figura 12).

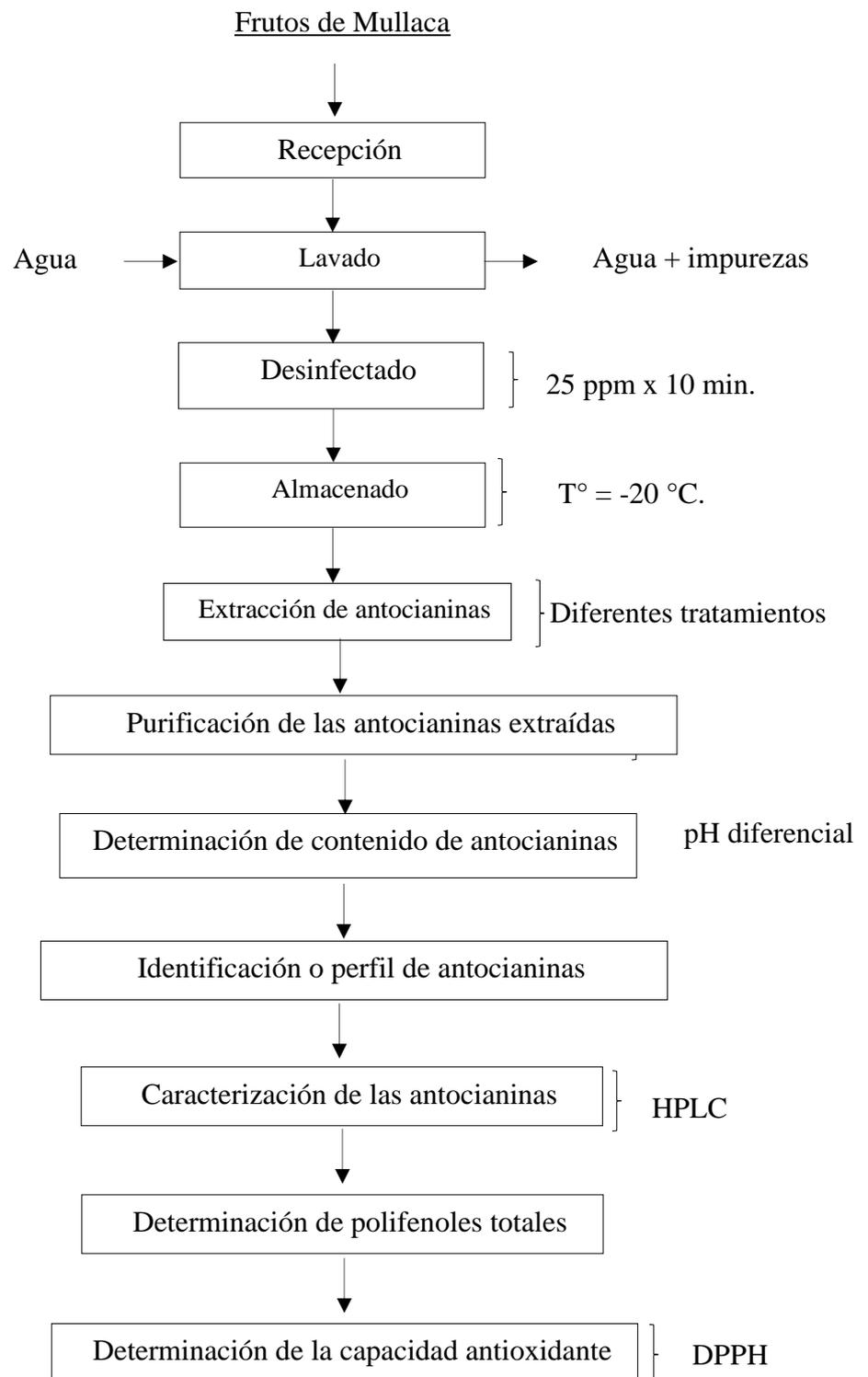


Figura 12. Diagrama de flujo para la obtención de antocianinas y evaluación de compuestos bioactivos de la mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*).

### **3.5.2 Descripción para la obtención de antocianinas y evaluación de compuestos bioactivos**

A continuación, describimos detalladamente el flujograma de la obtención de antocianinas y evaluación de compuestos bioactivos de la mullaca (*Muehlebeckia volcánica*).

#### **Recepción**

La recepción de las muestras se hizo de acuerdo a las instrucciones detalladas en el ítem's 3.3 de junio del 2018 en la cantidad de 5 kg.

#### **Lavado**

Proceso que se efectúa para remoción de impurezas con agua.

#### **Desinfectado**

Se aplicó una solución de hipoclorito de sodio de 25 ppm por 5 minutos, para desinfectar y eliminar cualquier patógeno que pueda dañar la epidermis de las muestras mientras se almacenan, luego ventiló suavemente el espacio y secado a temperatura ambiental.

#### **Almacenado**

Después de la desinfección de los frutos de mullaca estos se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se creó un plan experimental para realizar los análisis correspondientes.

#### **Extracción de antocianinas**

Los pigmentos antocianos se extrajeron utilizando metanol acidificado al 0,01% con HCl como disolventes según el método propuesto por (Aguilera *et al.*, 2011) con algunas modificaciones (Barragán *et al.*, 2018).

#### **Procedimiento**

1. Las muestras se pesaron en un rango de 0.3 – 1 g de frutos de mullaca congelados dependiendo el estado de la materia prima.

2. Una vez colocado el fruto en un mortero con 20 mL de metanol acidificado con HCl 0,01%, se debe triturar para extraer el líquido- sólido, que luego se debe filtrar al vacío con papel Whatman N° 40.
3. Concentrar el filtrado a 2/3 de su volumen original a presión reducida en un rotavapor a 100 mbar y 50 °C, centrifugar el extracto concentrado y aforar a 10 mL con HCl 0,01% para evitar la oxidación del extracto y almacenar -20 °C para su posterior análisis, purificación y evaluación, todo procesado por duplicado.

### **Purificación de las antocianinas extraídas usando C-18**

#### **Procedimiento**

1. El objetivo de utilizar cartucho C-18 es para separar compuestos relativamente hidrofóbicos, como las antocianinas, azúcares y ácidos.
2. Pasar dos volúmenes de metanol acidificado (10 mL cada uno) acondicionará la columna C-18.
3. Para eliminar cualquier resto de metanol, pasar el cartucho por tres volúmenes de agua acidulada (15 mL).
4. Pasar 10 mL del extracto acuoso acidificado de antocianinas del fruto de mullaca por el cartucho C-18, en este punto, la fase solida del cartucho se colorea, si el color del pigmento es más coloreado, agregue 5 ml de extracto según sea necesario. Luego pasar por la cantidad necesaria de acetato de etilo para arrastrar impurezas.
5. Para eliminar sustancias que no se absorben, como azúcares y ácidos orgánicos, enjuague el cartucho dos veces con 15 mL de HCl (0,01%).
6. Tome la muestra y colóquela en un vial resistente al calor con metanol acidificado cúbralo con papel aluminio.
7. Retirar el metanol evaporándolo durante 5 a 10 min. en un baño isotérmico a 40 °C.
8. Coloque el pigmento purificado en viales de HPLC para que pueda examinarse mediante espectrofotometría, cromatografía HPLC y otros métodos para analizar compuestos bioactivos. Preferiblemente ejecute HPLC durante dos horas y luego almacene la muestra restante a 4 °C en el refrigerador.

## **Determinación del contenido de antocianinas (CAT) por el método pH diferencial**

Las concentraciones de antocianina monomérica se determinaron mediante el método de pH diferencial propuesto por (Giusti y Wrolstad, 2001; Barragán, 2017). Para lo cual se toma, una alícuota de extracto de antocianina se mezcló con solución tampón de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M a pH 1,0 y otro con tampón de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) 0.4 M a 4.5 de pH. Se trata de un método espectrofotométrico basado en la transferencia estructural de las antocianinas en función del pH (coloreado a pH 1 e incoloro a pH 4.5).

La cantidad de antocianina está inversamente correlacionada con la diferencia de absorbancia en la longitud de onda de máxima absorción (520 nm). Después de eso, se midió la absorbancia a 700 nm para ajustar los resultados a la presencia de sustancias que interfieren o se degradan como chalconas y hemiacetales.

- Medido con un espectrofotómetro Genesys 10S de UV-VIS Spectronic, USA, utilizando agua ultrapura como blanco.
- La concentración de antocianinas se expresa en mg de antocianina-3-glucósido/100 mL. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

### **Procedimiento**

Pese una cantidad de frutos de mullaca congelada, luego use metanol acidificado para extraer el pigmento (ver extracción de antocianinas).

1. Determine el factor de dilución apropiado para cada mezcla diluyendo con tampón de cloruro de potasio (pH 1) hasta que la absorbancia de cada muestra indique la longitud de onda máxima para antocianinas (520 nm) este entre el rango 0 a 1 UA para cumplir la ley de Beer. Dividir el volumen final de la muestra leída en el espectrofotómetro por el volumen inicial o (volumen de la alícuota) tomado del extracto para obtener el factor de dilución (FD).
2. Se prepararon dos diluciones de cada muestra por triplicado, una para la absorbancia a 520 nm y otra para la absorbancia a 700 nm, utilizando buffer cloruro de potasio (pH 1,0) y acetato de sodio (pH 4,5) respectivamente, diluyendo

cada uno con el factor de dilución determinado previamente. Deje que estas diluciones se equilibren durante 15 minutos.

3. La absorbancia de cada dilución final se midió en las longitudes de onda anteriores en un espectrofotómetro usando agua destilada como blanco.
4. Calcular el cambio de absorbancia (A) de la muestra diluida el cambio absorbancia (A) de la muestra diluida para lo cual utilizar la siguiente fórmula:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad \text{Ec. 2}$$

5. Calcular la concentración de pigmentos de antocianinas monoméricas en la muestra original usando la siguiente formula:

$$CAT(mg/L) = \frac{A \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l} \quad \text{Ec. 3}$$

Para convertir el CAT (mg/100g) se emplea la siguiente ecuación:

$$CAT(mg/L) = \frac{A \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l} * \left(\frac{V}{W}\right) * 1000 \quad \text{Ec.4}$$

Donde:

CAT : Contenido de antocianinas totales (mg/L)

A : Cambio de la Absorbancia

PM : Masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449.2 g/mol.

$\epsilon$  : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900 L/mol.cm

l : Camino óptico de celda, 1 cm.

FD : Factor de dilución

V : Volumen de aforo de extracto (mL)

W : Peso muestra (g)

Para obtener el cambio de absorbancia a diferentes valores de pH, para obtener el valor de cada extracto deberá efectuar por duplicado, primero calcule el cambio en la absorbancia A, de acuerdo a la ecuación 1 y sustituya este valor en la ecuación 3

de contenido total de antocianinas CAT (mg/L). El procedimiento se repitió para todos los tratamientos estudiados.

### **Identificación o perfil de antocianinas por HPLC**

El método utilizado es el propuesto por (Giusti y Wrolstad, 2001) con algunas modificaciones (Barragán, 2017).

### **Hidrolisis ácida de las antocianinas**

El método se basa en la obtención de agliconas que son las antocianidinas, separando el azúcar y otras sustancias, como los ácidos estructuralmente relacionados con las antocianinas, tienen el único propósito de reconocer las antocianinas en el pigmento.

### **Procedimiento**

1. Agregar 1 ml del extracto acidificado resultante a un vial de 20 ml, agregar 10 ml de HCl (3N), cerrar bien, envolver con papel de aluminio, hervir en un baño a temperatura constante, repetir tres veces.
2. Se deben hidrolizar tres muestras en 45 minutos.
3. Luego se colocó los viales en un baño de hielo.
4. El hidrolizado previamente obtenido se aplicó a una columna C-18 previamente activada con metanol y enjuagada con agua acidificada.
5. Las impurezas se lavaron con acetato de etilo (5 ml).
6. Enjuague con agua acidificada (10 ml).
7. Las antocianinas se diluyeron con etanol acidificado (5 ml) y se recogieron en viales de HPLC (1 mL) para análisis por HPLC. Debido a que las antocianinas son muy inestables, es mejor analizarlas dentro de los 60 minutos posteriores a la preparación, por lo tanto, mantenga las muestras refrigeradas en la oscuridad hasta la lectura de HPLC.

### **Caracterización de antocianinas por HPLC**

HPLC es el método más utilizado para el análisis de antocianidinas. Las muestras fueron semipurificadas usando una columna C-18 y la fracción fenólica (que contenía antocianinas) se diluyó con etanol acidificado con HCl (1%). Completar hasta el volumen conocido con agua acidificada con HCl (0,01%).

La separación de antiantocianidina se realizó utilizando un sistema HPLC Agilent serie 1200 equipado con un detector de matriz de diodos (DAD) de 520 nm utilizando una columna C-18 eclipse XDB – C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5  $\mu$ m) la presión de trabajo será de 200 bar, el caudal es de 0,8 mL/min; la fase móvil es una mezcla de eluyentes A y B que consta de los siguientes disolventes:

- Solvente A: 95% (ácido acético 10%), (Acetonitrilo 5%) y (Ácido fosfórico 1%).
- Solvente B: 5% (acetonitrilo grado HPLC)

Para una adecuada separación de antocianidinas en el fruto, se establecerá un rango de flujo de 0,8 mL y se monitoreará a 520 nm, y se inyectará un volumen de 1  $\mu$ L de muestra prepurificada en el cartucho C-18 descrita, terminó a 30°C. Las condiciones del método de análisis de antocianinas por HPLC se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

*Condiciones para el análisis por HPLC para antocianinas*

<b>Instrumento</b>	<b>HPLC Agilent Technologies con detector DAD</b>
Cromatógrafo	: Agilent serie 1200
Software	: Chemstation VO3.02
Columna	: Zorbax SB- C18 4.6 x 75mm, 3.5 $\mu$ m.
Pre Columna	: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5 $\mu$ m 0.5 ml/min.
Flujo de Columna	: Ácido Acético: Acetonitrilo: H3PO4 (10%:5%:1%)
Solvente A	: Acetonitrilo.
Solvente B	: 0 a 2 min 0% B, 14.50 min 50% B, a 15 min 100 %
Sistema de Análisis	: B
Detección DAD	: 520 nm
Temperatura del Horno	: 40.0°C
Tiempo de Análisis	: 15 min
Volumen de Inyección	: 1.0 $\mu$ L
Tratamiento de la Muestra:	Extracción y purificación

Para determinar la identificación de los picos de antocianidinas se compararon los cromatogramas a 520 nm y los tiempos de retención de extractos comparados de

antocianidinas de las especies de uva y fresa, para determinar la presencia de los mismos que fueron corridos a las condiciones establecidas ver (Tabla 5).

La metodología para el objetivo específico 3: la identificación del contenido de antocianinas en frutos de mullaca a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  fue mediante el método de cromatografía líquida HPLC; y el perfil de antocianinas o identificación el cual se analizó por HPLC para antocianidinas comparándolos o identificándolos con espectros de uva y fresa.

### **Determinación de polifenoles totales**

Zapata *et al.* (2014) Utilizo el método que consiste en aplicar la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, para determinar el contenido fenólico total de EA, mezcle 50  $\mu\text{L}$  de este con EA con 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu. Luego agregue 100  $\mu\text{L}$  de solución de carbonato de sodio al 20% y 800  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura. La mezcla se agitó a 1600 rpm durante 30 segundos y se incubó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente ( $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en la oscuridad. Luego se midió la absorbancia a 760 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Nicolet iS10 con diamante ATR, USA). Se utilizaron como medidas en blanco 850  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura, 100  $\mu\text{L}$  de solución de carbonato de sodio al 20% y 50  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu. El contenido de polifenoles se determinó usando 0-0,2 (mg/mL) de ácido gálico como estándar. Los resultados se expresan como mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g de mullaca.

### **Capacidad antioxidante método DPPH**

Primero, se prepara una solución madre de radicales libres DPPH con una concentración de 200 mg/L. Para las determinaciones analíticas, esta solución madre se diluyó 1/10 con metanol (Zapata *et al.*, 2014). Para medir la capacidad antioxidante del extracto de mullaca, mezclar 10  $\mu\text{L}$  del extracto con 990  $\mu\text{L}$  de solución diluida de radicales libres DPPH, agitar a 1600 rpm durante 30 segundos y almacenar a temperatura ambiente ( $25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en oscuridad por 30 minutos. Luego se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Nicolet iS10 con diamante ATR, USA). Se preparó un control mezclando 10  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura con 990  $\mu\text{L}$  de solución radical DPPH diluida y se utilizó como un extracto. Utilizando estos datos, calcular el cambio en la absorbancia 30 minutos después del inicio de la reacción entre los radicales libres y los antioxidantes presentes en el

extracto (absorbancia de control menos absorbancia del extracto). La calibración se realizó utilizando una solución de Trolox y la actividad antioxidante total se expresó como mg de equivalente de Trolox/100 g de mullaca.

## **b. Aplicación de prueba estadística inferencial**

### **Planteamiento de hipótesis:**

**Ho:** La optimización del proceso de extracción ( $T^\circ$ , pH y tiempo) no tiene un efecto en el contenido total de antocianinas CAT.

$$T1 = T2 = T3 = \dots = Tn$$

**Ha:** La optimización del proceso de extracción ( $T^\circ$ , pH y tiempo) tiene un efecto en el contenido total de antocianinas CAT.

$$T1 \neq T2 \neq T3 \neq \dots \neq Tn$$

**Nivel de significancia:**  $\alpha = 0.05$  (5%)

### **Análisis estadístico**

Para analizar los principales compuestos funcionales según los objetivos propuestos, específicamente el contenido de antocianinas totales (CAT) expresados en (mg cianidina-3-glucósido/100g) de extracto, se realizó utilizando un método de superficie de respuesta (Jiménez, 2015) aplicando el diseño central compuesto DCCR de 23 + estrella con software STATGRAPHICS Centurión XVII, se desarrolló de la siguiente manera (Tablas 4 y 6).

Para el presente estudio se generó 17 tratamientos con 2 repeticiones con un total de 34 observaciones considerando la siguiente fórmula:

$$N = 2k + 2k + m \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

N : Número de tratamientos.

K : (3 variables).

2 : Nivel de estudio (superior e inferior).

$2^k$  : Número de puntos factoriales (temperatura, pH y tiempo).

$2k$  : Número de puntos axiales.

$M$  : Número de réplicas del punto central (2).

Además, como se muestra en la siguiente ecuación, la característica del diseño central compuesto rotacional establece los puntos axiales para un diseño de dos factores.

$$\pm \alpha = (F) 1/4 = (2) 1/4 = (2\ 3) 1/4 = 1,682 \quad (\text{Ec. 6})$$

Las variables del presente estudio y la operacionalización se muestran a continuación:

Tabla 6

*Tratamientos obtenidos mediante el Diseño Compuesto Central (DCCR) + estrella*

Tratamientos	N° Repetición	Temperatura	pH	Tiempo	Valores codificados			CAT
		$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
T1	2	20	3	180	-1	-1	-1	-
T2	2	60	3	180	1	-1	-1	-
T3	2	20	4	180	-1	1	-1	-
T4	2	60	4	180	1	1	1	-
T5	2	20	3	300	-1	-1	1	-
T6	2	60	3	300	1	-1	1	-
T7	2	20	4	300	-1	1	0	-
T8	2	60	4	300	1	1	0	-
T9	2	6.36414	3.5	240	- 1.682	0	0	-
T10	2	73.6359	3.5	240	1.682	0	0	-
T11	2	40	2.6591	240	0	- 1.682	0	-
T12	2	40	4.3409	240	0	1.682	0	-
T13	2	40	3.5	139.092	0	0	- 1.682	-
T14	2	40	3.5	340.908	0	0	1.682	-
T15	2	40	3.5	240	0	0	0	-
T16	2	40	3.5	240	0	0	0	-
T17	2	40	3.5	240	0	0	0	-

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Resultados

##### **4.1.1 Optimización del proceso de extracción (temperatura, pH y tiempo) de antocianinas totales en frutos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*).**

Los datos experimentales obtenidos para las diferentes combinaciones ensayadas (17 tratamientos) y su respectiva respuesta en CAT (contenido de antocianinas totales en mg cianidina-3-glucósido/100 g) se muestran en la Tabla 7. A partir de los mismos, se estudió el efecto de las variables de extracción: temperatura, pH y tiempo en el contenido total de antocianinas.

Durante la extracción de antocianinas totales de frutos de *mullaca* (*Muehlenbeckia volcánica*), se observó que el modelo explicó significativamente ( $p > 0.05$ ) el contenido de antocianinas totales (CAT). Los resultados de ANOVA (Anexo 5) indicaron que las variables del estudio, temperatura, pH y tiempo, no fueron significativas para la extracción de antocianinas. Asimismo, los coeficientes al cuadrado y las interacciones de las variables de estudio no fueron significativos ( $p > 0,05$ ).

Tabla 7

Resultado de los tratamientos obtenidos mediante el DSR.

Tratamientos	Factores de extracción			Respuesta			
	T °C	pH	Tiempo min.	CAT (mg cianidina3-glucosido/100 g)			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	CAT1	CAT2	X	DE
T1	20	3	180	87.99	82.84	85.42	85.84±3.6
T2	60	3	180	123.79	106.29	115.04	115.04±12.4
T3	20	4	180	108.70	104.87	106.79	106.79±2.7
T4	60	4	180	104.41	150.62	127.52	127.52±32.7
T5	20	3	300	106.40	93.66	100.03	100.03±9.0
T6	60	3	300	127.76	127.37	127.57	127.57±0.3
T7	20	4	300	128.13	111.30	119.72	119.72±11.9
T8	60	4	300	81.13	120.33	100.73	100.73±27.7
T9	6.36414	3.5	240	123.57	114.10	118.84	118.84±6.7
T10	73.6359	3.5	240	82.53	106.60	94.57	94.57±17.0
T11	40	2.6591	240	126.01	111.19	118.60	118.6±10.5
T12	40	4.3409	240	112.49	90.25	101.37	101.37±15.7
T13	40	3.5	139.092	95.03	124.61	109.82	109.82±20.9
T14	40	3.5	340.908	140.18	122.42	131.30	131.3±12.6
T15	40	3.5	240	108.76	123.51	116.14	116.14±10.43
T16	40	3.5	240	124.64	152.20	138.42	138.42±19.5
T17	40	3.5	240	127.35	96.62	111.99	111.99±21.7

El valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0.9089, lo que indica que el modelo establecido puede explicar el 90.89% de la variación en el contenido de antocianinas (Tabla 7). Con base en esto, utilizando la Ecuación 1 y los coeficientes de regresión para predecir el contenido total de antocianinas CAT en (mg cianidina-3-glicósido/100g) (Anexo 6), se calculó la siguiente superficie de respuesta.

$$CAT = -389.93 + 4.56T + 181.76pH + 0.77t - 0.01T^2 - 0.69TpH - 0.00Tt - 16.17pH^2 - 7pHt + 0.00t^2$$

Donde:

T: temperatura (°C)

t: tiempo de extracción (h)

Con base en la ecuación anterior, se presenta el gráfico de superficie de respuesta (Figura 13), la cual muestra los efectos de las variables cuantitativas de temperatura,

pH y tiempo de extracción y su efecto sobre el contenido total de antocianinas-CAT, y se observa que la temperatura y el pH disminuyen al incrementar el tiempo, aumentando el contenido de antocianinas del mismo modo este efecto se muestra en el gráfico de contornos de superficie de respuesta para el contenido total de antocianinas (Figura 14).

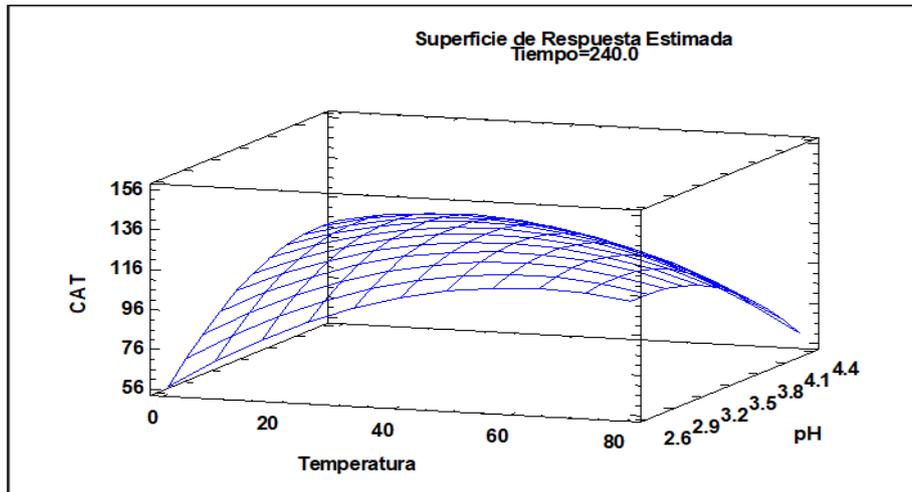


Figura 13. Gráfica de superficie de respuesta con su respectivo contorno para el contenido de antocianinas de extracto de mullaca (*Muehlebeckia volcánica*).

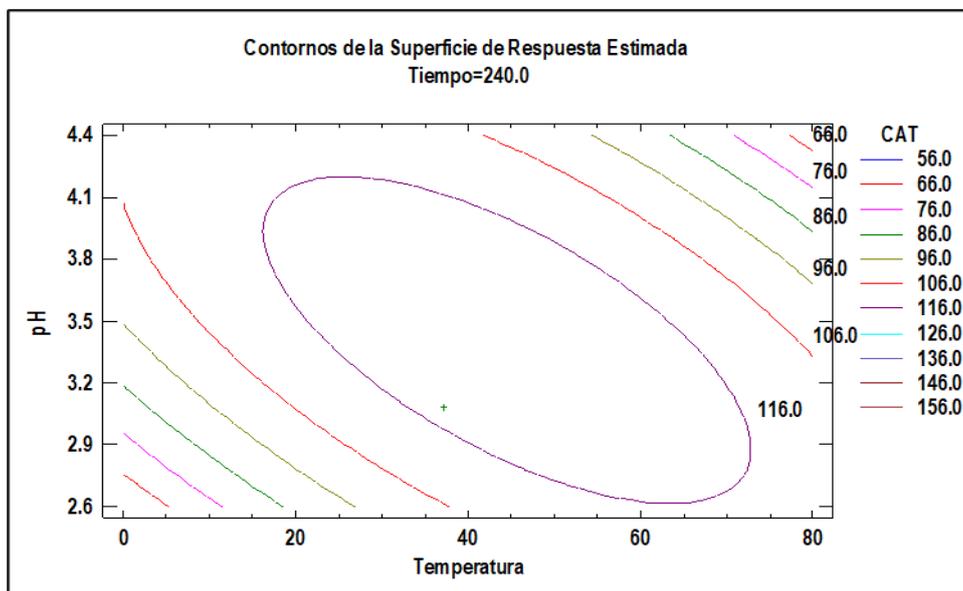


Figura 14. Gráfica de superficie de respuesta con su respectivo contorno para el contenido de antocianinas de extracto de mullaca (*Muehlebeckia volcánica*).

Para el contenido de antocianinas totales (CAT) se presenta el resultado estimado en (Tabla 8), en donde se visualiza los datos observados, ajustados los límites inferiores y superiores.

El estadístico  $R^2$  ajustado (coeficiente de determinación) mostró que el modelo predijo el 97% de la variación del contenido de antocianinas totales CAT. Los niveles de los factores experimentales bajo investigación se obtuvieron utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM): temperatura, pH y tiempo en el que se maximizó el CAT. Se encontró que la temperatura de 37,19 °C, el pH de 3,0 y el tiempo de extracción de 340 minutos eran la combinación más adecuada de factores experimentales, y en esta condición se obtuvo la extracción óptima de 130.04 (mg cianidina-3- glucósido/100g).

Tabla 8

*Resultados estimados para el contenido de antocianinas totales CAT (mg cianidina-3- glucósido/100g)*

Tratamientos	Factores de extracción			Resultados CAT			
	T °C	pH	Tiempo min.	(mg cianidina-3-glucósido/100 g)			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Observado	Ajustado	Inferior 95%	Superior 95%
						Para media	Para media
T1	20	3	180	85.42	88.89	59.6	118.18
T2	60	3	180	115.04	115.84	86.55	145.13
T3	20	4	180	106.79	112.66	83.37	141.95
T4	60	4	180	127.52	111.9	82.61	141.19
T5	20	3	300	100.03	116.82	87.53	146.11
T6	60	3	300	127.57	122.88	93.58	152.17
T7	20	4	300	119.72	120.09	90.8	149.38
T8	60	4	300	100.73	98.44	69.15	127.73
T9	7	3.5	240	118.84	103.65	75.75	131.54
T10	74	3.5	240	94.57	108.10	80.21	135.99
T11	40	2.659	240	118.6	109.44	81.54	137.33
T12	40	4.340	240	101.37	108.88	80.98	136.77
T13	40	3.5	139.092	109.82	113.65	85.75	141.54
T14	40	3.5	340.908	131.3	125.82	97.92	153.71
T15	40	3.5	240	116.14	122.28	101.66	142.90
T16	40	3.5	240	138.42	122.28	101.66	142.90
T17	40	3.5	240	111.99	122.28	101.66	142.90

Aguilera et al. (2011) utilizamos el método propuesto por para extraer el extracto de antocianinas de la mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*) (con algunas modificaciones) (Barragán *et al.*, 2018) utilizando como solventes metanol acidificado al 0.01% con HCl. Sin embargo otros autores describieron el uso de éter de petróleo, acetato de etilo y metanol; secando a presión con un rotavapor (Navarro, 2018). Aunque el etanol se utiliza con frecuencia para extraer los componentes activos de las plantas, se considera que el agua es un disolvente universal debido a su capacidad para extraer tanto en fase sólida como líquida (Ullauri, 2010). En términos de optimización, es un método formal para identificar la mejor solución a un problema en la toma de decisiones. El elemento más importante de un problema de optimización es la función de un propósito influenciado por ciertos factores.

Estudiaron el efecto de la conservación por congelado a diferentes temperaturas sobre el contenido total de antocianinas de los frutos de mora (*Rubus glaucus Benth*) (Sanchez, 2012) y encontraron que a temperaturas de conservación más bajas, como (-4°C), el contenido de las antocianinas aumentó de 28 a 85 (mg cianidina-3-glucósido/100 g), lo que indica que esta temperatura podría ser buena para estimular el contenido de los compuestos mencionados con alto potencial antioxidante, pero este aumento también puede deberse a la concentración de estos compuestos en el fruto por pérdida de líquido (% humedad). En un estudio reportado por (Barragán y Aro 2018), cuando en frutos de mio mio se conservación en congelado (-20°C), su CAT aumentó de 440,22 a 1102,88 (mg cianidina-3-glucósido/100 g), confirmando un aumento en la cianina total. contenido, lo cual corrobora que a temperaturas bajo cero el contenido de antocianinas totales se incrementa.

En este trabajo de investigación, se optimizo la extracción de antocianinas totales utilizando tres factores para la extracción para la extracción, que son temperatura °C, pH, tiempo en minutos en frutos congelados a (-20 °C), teniendo como resultado el contenido total de antocianinas de acuerdo a la Tabla 5, en el cual podemos observar que el tratamiento con mayor valor es del (T16) con 138.42 (mg cianidina3-glucosido/100 g) y el valor menor del (T1) con 85.42 (mg cianidina3-glucosido/100 g). En la (Tabla 6) se observa el análisis de varianza respecto a los efectos (temperatura, pH y tiempo), las estadísticas y utilizando la metodología de superficie de respuesta, se tiene como resultado que no existe diferencias significativas en el contenido de antocianinas totales. Las antocianinas son muy sensibles a los cambios

de pH (Wong, 1994) lo que se debe a una deficiencia del núcleo del flavilio u oxonio que son las formas más estables de las antocianinas, estos pigmentos actúan como verdaderos indicadores de pH; es decir su color depende de la condición de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran. En el estudio realizado la temperatura estuvo en el rango (7 a 60°C), pH (2.6 a 4) y tiempo (139 a 340 min), no afectaron significativamente el contenido total de antocianinas, lo que explicaría que los rangos de temperatura no son particularmente altos, al igual que pH no es mayor a 7 al igual que el tiempo. Si embargo se observa que al incrementar el tiempo y disminuir la temperatura y el pH aumenta el contenido total de antocianinas (Figura 11).

#### 4.1.2 Compuestos bioactivos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*)

La cuantificación de antocianinas totales se basa en la transformación estructural de las antocianinas a 520 y 700 nm en función del pH 1,0 y 4,5, expresado el contenido de antocianinas en miligramos equivalentes de Cianidina-3- glucósido presentes en 100 g de muestra de mullaca en relación con las antocianinas tanto por pH diferencial y HPLC (Tabla 9), se muestra su respectivo cromatograma en la (Figura 15).

Tabla 9

*Resultado de comparativo del contenido de antocianinas totales.*

Producto	Método pH diferencial			Método HPLC
	Resultado de investigación		Optimizado	Determinación
	CAT bajo (T1)	CAT alto (T6)	CAT *	CAT (-4°C) **
Fruto mullaca - 20°C	85.84± 3.6	138.42± 19.5	130.04± 19.0	140.90± 0,02

Condiciones de extracción:

T1= T: 20°C, pH: 3 y tiempo: 180 min. CAT= (mg cianidina-3-glucósido/100g)

T6= T: 40°C, pH: 3,5 y tiempo: 240 min. CAT= (mg cianidina-3-glucósido/100g)

\*CAT óptimo=T: 37°C, pH: 3.0 y tiempo: 340 min. (mg cianidina-3-glucósido/100g)

\*\*CAT (HPLC)= T:40°C, pH: 3.0 y tiempo: 15 min. (mg cianidina-3-glucósido/100g)

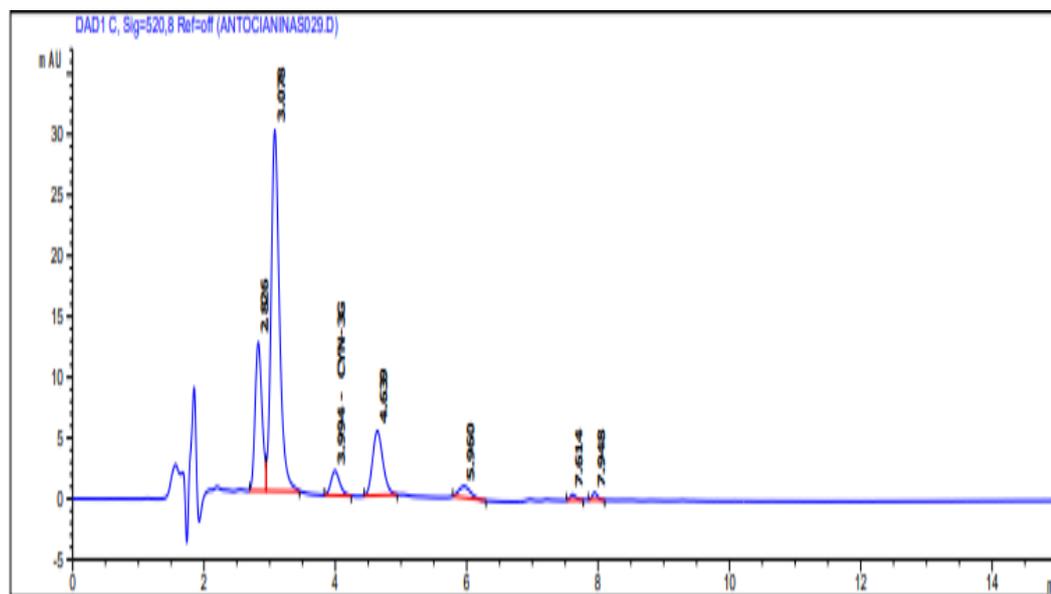


Figura 15. Antocianinas- Cromatograma de HPLC en extracto de Mullaca (*Muehlebeckia volcánica*)

Así mismo, podemos señalar que la muestra optimizada se llevó a determinar sus compuestos bioactivos (Tabla 9) en este caso las antocianinas por el método de HPLC y se obtuvo un valor mayor a lo optimizado, de 140 mg cianidina-3-glucósido/100g. Estos resultados obtenidos en la determinación de antocianinas, expresa frente a una curva patrón del estándar de cianidina-3-glucósido/100g. Mucho mayor de lo esperado. Para la identificación de antocianidinas el resultado se presenta en la Tabla 10, se identificó a las antocianidinas mediante cromatografía y se compararon los picos del cromatograma de HPLC (Figura15) de frutos de mullaca con los de uva y fresa, se identificaron los espectro UV-Vis de las muestra y se compararon con la base de espectro UV de las antocianidinas de la uva y fresa, se encontraron la posible presencia de los siguientes tipos de antocianidinas en el fruto de Mullaca: Delfinidina (1) 76.3 %, Cianidina (2) 20.5% y Petunidina (3) 3.1%. De igual manera han encontrado por HPLC, cianidina en antocianinas de capulí (*Prunus serótina spp* Capuli) presentándose como antocianidina en mayor porcentaje (Del Carpio, *et al.*, 2009). También han encontrado por HPLC, antocianidina en frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L) (Barragán *et al.*, 2018)

Tabla 10

Contenido de antocianidinas individuales identificadas en el extracto de mullaca-HPLC

Pico	Identificación de antocianidinas -HPLC	Porcentaje respecto al total de antocianinas presentes
1	Delfinidina	76.30%
2	Cianidina	20.50%
3	Petunidina	3.10%

En las Figuras 16 y 17 se muestra los cromatogramas obtenidos en la muestra de la investigación, bastante similares son estos perfiles a los encontrados por (Barragán *et al.*, 2020) para frutos nativos *Muehlenbeckia volcánica* en extracto identificaron antocianidinas: delfinidina y petunidina, en nuestra investigación pudimos identificar tres antocianidinas (delfinidina, cianidina y petunidina) con su respectivo porcentaje al total de antocianinas presentes y con muestras conservadas a -20 °C (Tabla 10) y (Figura 17).

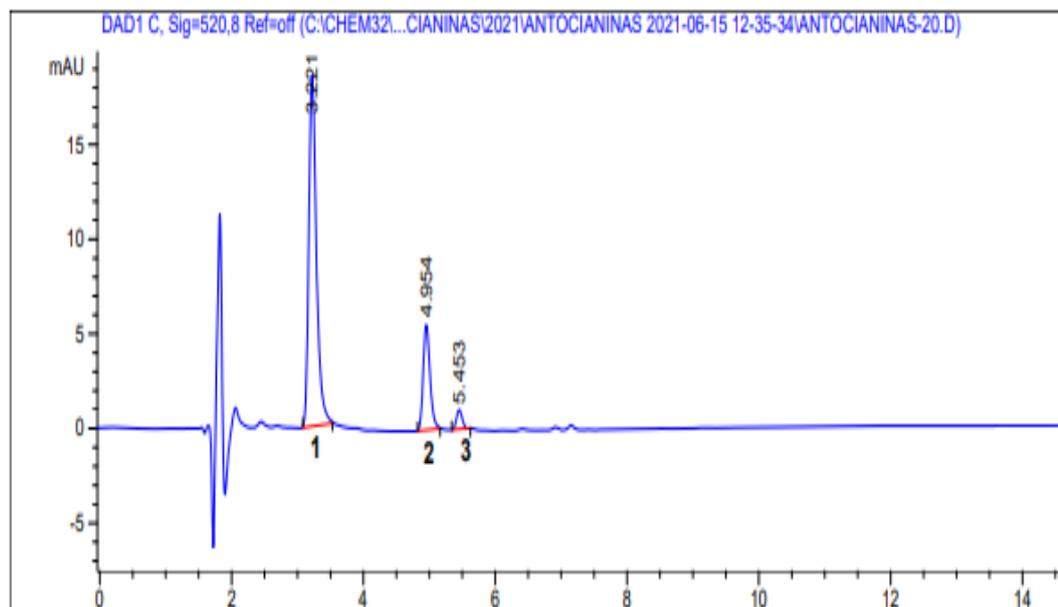


Figura 16. Antocianidinas-Cromatograma de HPLC en extracto de Mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*).

### Espectros UV

### Espectro UV Comparados

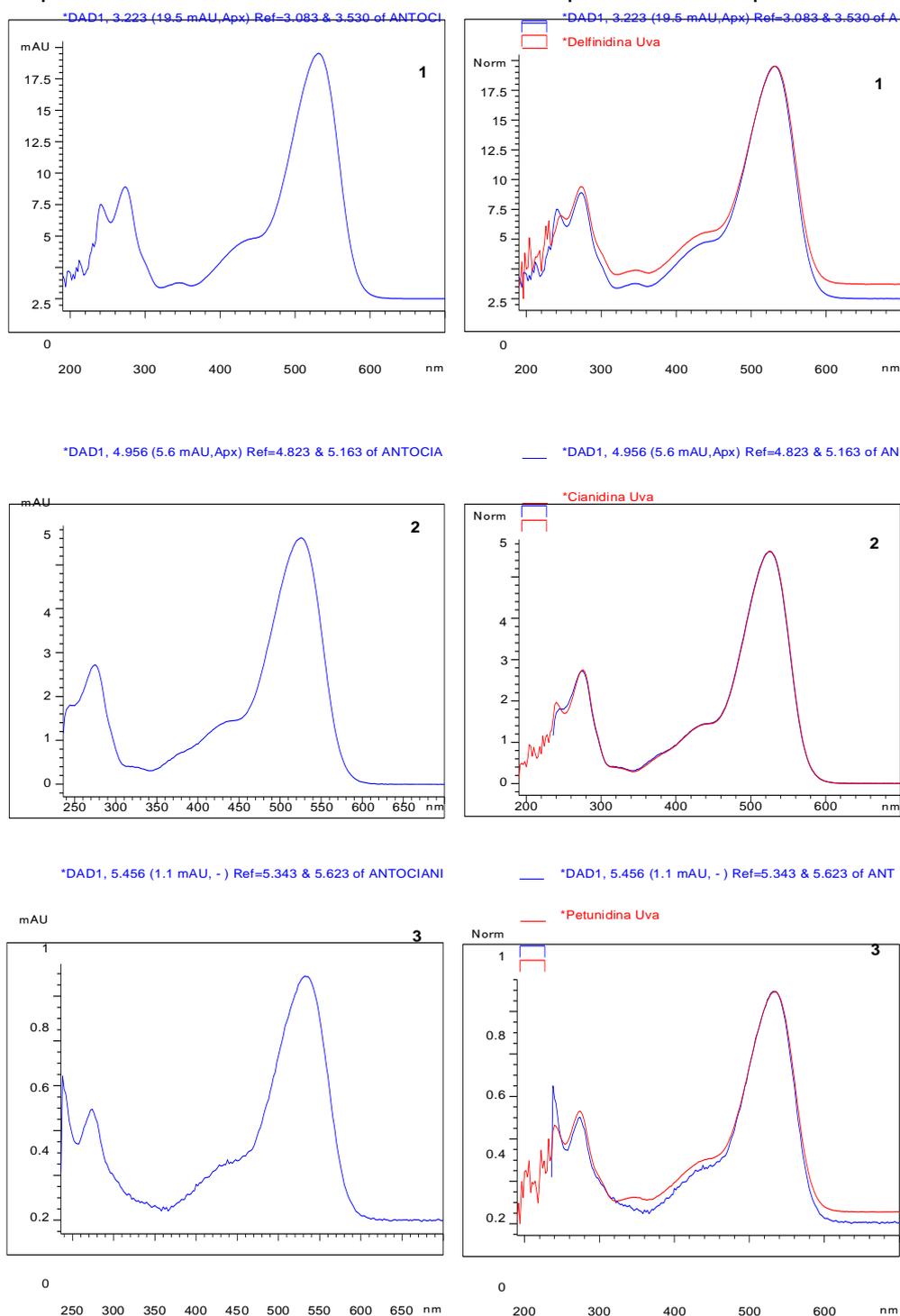


Figura 17. UV Vis de extractos de mullaca (*Muehlebeckia volcánica*) comparado con antocianinas obtenidas a partir de los frutos de uva y fresa.

En un estudio sobre el fruto de *Muehlebeckia volcánica* (Benth), sus extracciones fueron de tipo antocianicos, la CI50 obtenida por el método DPPH fue de 2,225  $\mu\text{g/mL}$ , y la CI50 fue de 1,6334  $\mu\text{g/mL}$  utilizando ácido ascórbico como patrón. En

uno de los estudios compararon la capacidad antioxidante no sólo con Trolox, sino con otro estándar. durante la misma prueba (Teves, 2011). Otro estudio reportó un valor de CI50 de 17,55  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y un estándar Trolox de 1,76  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obtenidos por extracción hidroalcohólica de toda la planta de mullaca (Navarro,2018). Comparando nuestros resultados, obtuvimos un valor IC50 de 25,02  $\mu\text{g}$  trolox/100g de fruto congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  de nuestro extracto de fruto congelado de mullaca (*Muehlebeckia volcánica*), lo que sugiere (Teves, 2011) que el valor del fruto se asemeja al valor del estudio desarrollado.

Los frutos de mullaca por otro lado, tenían un contenido total de polifenoles ligeramente superior que el contenido de antocianinas (Tabla 11), lo que indica la presencia de compuestos fenólicos de los distintos pigmentos antociánicos. La actividad antioxidante del fruto de mullaca fue casi similar a la encontrada por (Barragán *et al.*, 2020) que es de  $31.37 \pm 7.19$  ( $\mu\text{mol}$  trolox/g) lo cual es una ventaja, porque los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con sus antioxidantes (Aguilera *et al.*, 2011), a pesar de que el DPPH solo miden los componentes que son solubles en agua (Kulkoski *et al.*, 2005).

Tabla 11

*Contenido de antocianinas, polifenoles totales y actividad antioxidante en mullaca.*

Muestra	Polifenoles totales (*)	Actividad antioxidante (**) DPPH
Mullaca Fruto congelado de mullaca a - 20° C	200.43 $\pm$ 0.2	25.2 $\pm$ 0.57

(\*) Los polifenoles totales en la mullaca se expresaron como mg ácido gálico/100g.

(\*\*) La actividad antioxidante en la mullaca se expresó como mL eq trolox CI50/100g.

Según(Kulkoski *et al.*, 2005) al evaluar la capacidad antioxidante de pulpas de diversas frutas congeladas comercializados en el sur de Brasil obtuvieron valores de 82.6 $\pm$ 2.6, 105.9 $\pm$ 0.4 y 959.1 $\pm$ 19.0 mg EAA/100g para mora, uva y acerola respectivamente con el método DPPH. Estos autores también determinaron el contenido fenoles totales en la pulpa de estos frutos, el cual alcanzó 118,9  $\pm$  2,1 mg GAE/100 mg de pulpa de mora y 117,1  $\pm$  0,6 mg GAE/100 mg de pulpa de uva y la

pulpa de acerola es de  $580,1 \pm 4,6$  mg GAE/100 mg. Además (Barragán *et al.*, 2020) determinaron que el contenido de antocianinas del extracto de mullaca (*Muehlembeckia volcánica*) es de 171.85 mg de cianidina-3-glucósido/100g, polifenoles totales de 275.55 mg ácido gálico/100g y su capacidad antioxidante de 31,37  $\mu$ mol trolox/g. Los resultados de la investigación muestran concentraciones de antocianinas totales, polifenoles totales y actividad antioxidante, semejantes a los encontrados por los autores señalados (Tabla 11).

Los resultados presentaron diferencias y estas podrían deberse en primer lugar a diferentes niveles de antioxidantes presentes en toda la planta de mullaca, habiendo investigaciones que toman como materia de estudio a toda la planta y en otros solo se enfocan en los frutos como en el presente estudio, en segundo lugar, el área de recolección es diferente porque en el desarrollo y crecimiento de la planta dependerá de la calidad de su composición química del suelo, los frutos utilizados para el estudio fueron muestreados en Abancay. Finalmente, por el tipo y metodología de extracción utilizado. En la (Tabla 11) se observa el contenido total de antocianinas y polifenoles totales.

## CONCLUSIONES

- La extracción total de antocianinas totales de frutos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*) fueron determinados cuantitativamente no existiendo diferencias entre los tratamientos.
- Los factores como temperatura, pH y tiempo no tuvieron efecto en la estabilidad del contenido de antocianinas totales cuyo valor optimizado es 130.04 (mg cianidina-3-glucósido/100g) a 37 °C de temperatura, pH de 3 y el tiempo de 340 min y por HPLC fue de  $140.9 \pm 0,02$  (mg cianidina-3-glucósido/100g) a 40 °C, pH 3.0 y tiempo 15 min.
- Entre las antocianidinas identificadas en el extracto destacaron delphinidina con 76.3 %, cianidina con 20.5% y petunidina con 3.1% expresados en cianidina 3 glucósido con muestras conservadas a -20°C. Contienen polifenoles y capacidad antioxidante, considerándose a la mullaca un fruto con potencial bioactivo benéfico para la salud, industria alimentaria y farmacéutica.



## RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar investigaciones sobre estos frutos de mullaca (*Muehlenbeckia volcánica*) cuyos efectos pueden variar al utilizar el método de superficie de respuesta con diferentes técnicas de extracción ente otros factores.
- Ampliar los conocimientos con mayor información de extracción de compuestos bioactivos como extracción en microondas y obtener el potencian bioactivo de diferentes frutos nativos.
- Evitar la luz al cuantificar los antioxidantes porque los reactivos necesarios para el método de aplicación son sensibles a la luz.
- Aplicar el potencial bioactivo de este fruto en la formulación de diferentes suplementos dietéticos y productos para el cuidado de la salud.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agapito, T., & Sung, I. (2005). *Fitomedicina: 1100 plantas medicinales*: Editorial Isabel. Perú: Editorial Isabel (Vol. 1).
- Aguilera-Otíz, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 13(2), 16-22.
- Arauco, K. (2016) Efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de *Muehlenbeckia volcánica* (Bentham) endlincher (Mullaca) sobre el granuloma inducido por carragenina en ratas. UNMSM. Lima-Perú.
- Arranz, S. (2010.). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Tesis para optar el grado de doctor en nutrición. Madrid. *Universidad Complutense de Madrid*.
- Barragan Condori, M., & Aro Aro, J. M. (2017a). Determinacion del efecto de procesos de coccion en papas nativas pigmentadas (*Solanum tuberosum* spp. andigena) sobre sus compuestos bioactivos. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(1), 47-52.
- Barragán Condori, Melquiades, Aro Aro, Juan Marcos, Huamaní Meléndez, Víctor Justiniano y Cartagena Cutipa, Raúl. (2018). Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mio - mio (*Coriaria ruscifolia* L). *Revista de Invest. Altoandinas*, 20(4), 419-428. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2018.419>
- Barragán Condori, M., Aro Aro, J. M., Muñoz Cáceres, A. E., & Rodríguez Mendoza, J. (2020). Determinacion de antocianinas y capacidad antioxidante en extractos de (*Muehlebeckia volcanica*). *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 22(2), 161-169. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.604>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Borges, G., Vieira, F., Copetti, C., Gonzaga, L., Fett, R. (2011). Optimization of the extraction of flavanols and anthocyanins from the fruit pulp of *Euterpe edulis*

- using the response surface methodology. *Food Res Int.* 44, 708–715. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.02>
- Cajías, M., & Fernandez, B. (1987). Manual de tintes naturales: SEMTA, Servicios Múltiples de Tecnologías Apropriadas.
- Cai L., Chen B., Yi F., Zou S. (2019). Optimización de la extracción de polisacáridos de raíz de diente de león por metodología de superficie de respuesta: Caracterización estructural y actividad antioxidante. *Revista internacional de macromoléculas biológicas*, 140, 907-919. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.161>
- Canalis B., Baroni V., León E., Ribotta D. (2020). Efecto de la incorporación de puré de durazno sobre la calidad de galletas y sobre la digestión simulada de polifenoles y propiedades antioxidantes. *Química alimentaria*, 333, 127464. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127464>
- Canchos, C. y Reyes, J. (2016). Determinación de capacidad antioxidante y fenoles totales en zumo y cáscara de *Vaccinium corymbosum*, arándanos del valle de Cañete. <http://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/UNJFSC/139>
- Castañeda, A., y Guerrero, J, A. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: Antocianinas. 9: 25 - 33: Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.
- Castillo, G., Michelena, G., Nogueiras, C., Ortega, G., Bello, D., Guerra, M., . . . Mieres, G. (2010). Caracterización cromatográfica y espectroscópica de un pigmento rojo obtenido a partir de *Bothryodiplodia theobromae*.
- Centeno, M. (2003). Extracción, estabilización y evaluaciones analíticas del Carmín. Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada. México
- Cornejo, A. (1986). Estudio Morfológico-estructural de plantas medicinales de uso más frecuente en Ayacucho. *Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho. Perú.*
- Chacón, L., & Octavio, S. (2015). Plantas tintóreas utilizadas en el teñido de textiles artesanales en el Perú.

- Chandra M, Barata A, Ferreira S, Malfeito M, Loureiro V. (2014) Un estudio de Metodología de Superficie de Respuesta sobre el papel de los factores que afectan el crecimiento y la producción de fenoles volátiles por *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 en el vino. *Microbiología de los alimentos* <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.002>
- Clifford, M. (2000). Anthocyanins - nature , ocurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 80, 1063-1072.Citado Pacheco Llamocca, C. E. (2019).Influencia de la temperatura y el pH en la estabilidad de antocianinas de los frutos de Zarzamora (*Rubus urticifolius* Poir.)
- Del Carpio Jiménez, C., Serrano Flores, C., & Giusti, M. (2009). Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(1), 76-86.
- De-La-Cruz, Horacio, Graciela Vilcapoma y Percy A. Zevallos. (2007). “Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Perú”. *Revista de Etnofarmacología 111. Flora del Perú. Actualización de datos*, 284–294.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). InfoStat.
- Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2001). Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC *Current protocols in food analytical chemistry*: John Wiley & Sons, Inc.
- Fennema, O. (2000). Química de los Alimentos. Zaragoza-España. *Editorial. ACRIBIA* , S.A.
- Garzon, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. Universidad Nacional de Colombia. 13: 27 - 36.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols: in Food Analytical Chemistry.*, 1- 13.

- González, R., Ballester, I., López, R., Suárez, M., Zarzuelo, A., Martínez, O. & Sánchez de Medina, F. (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* Apr; 51(4):331-62.
- Gorriti, A., Quispe, F., Arroyo, J. L., Córdova, A., Jurado, B., Santiago, I., & Taype, E. (2009). Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays* L. Maíz morado. *Ciencia e investigación*, 12(2), 64-74.
- Guerrero, J., Ciampi, L., Castilla, A., Medel, F., Schalchli, H., Hormazabal, E., . . . Alberdi, M. (2010). Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4), 537-544.
- Haytowitz, D. B., & Bhagwat, S. (2010). USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, Release 2. US Department of Agriculture, 10-48.
- Lagos D, Quinto R. 2018. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. (Mullaca) en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, in vitro. Tesis de Título. Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Lima, Perú.
- León, S., & Elisa, D. (2012). *Estudio del potencial antioxidante de la mora (Rubus glaucus Benth) y sus cambios en función del proceso de maduración y bajo diferentes temperaturas de almacenamiento*. Universidad Nacional de Colombia. <http://bdigital.unal.edu.co/10581/>
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*: Corporación Universitaria Lasallista.
- Lyon, P. J. (1992). Lost Crops of the Incas: Little-known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. *The Journal of Latin American and Caribbean Anthropology*, 4(1), 41-41.
- Mantilla J, Olazabal O. (2008). *Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra. 2a ed.* Cusco: Instituto de Ecología y Plantas Medicinales “Pachamama Hampi.

- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271-278.
- Martínez, A. (2005). Flavonoides: Tesina. Facultad de Química Farmacéutica. *Flavonoides: Tesina. Facultad de Química Farmacéutica.*
- Medina, G. (2012). Extracción del colorante antocianina a partir del maíz morado y su aplicación en la industria alimentaria. Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion . Huacho - Peru.
- Mellado, M., Madrid, A., Jara, C. & Espinoza, (2012). Antioxidant effects of *Muehlenbeckia hastulata* j. (polygonaceae) extracts. *J. Chil. Chem. Soc.*, 57, No 3, 1301-1304
- Mellado, M., Madrid, A., Peña, H., López, R., Jara. C & Espinoza, L. (2013). Antioxidant activity of anthraquinones isolated from leaves of *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.SM.) Johnst. (polygonaceae). *J. Chil. Chem. Soc.* Vol.58(2):1767-1770
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- MINAGRI (2017). Anuario Agrícola. Lima : Ministerio de Agricultura.
- Mostacero J, Razuri T, Gil A. (2015.). Fitogeografía y morfología de los *Vaccinium* (Ericaceae) “arándanos nativos” del Perú. Pág 43-52. [Citado el 22 de octubre del 2020] Disponible en: file:///C:/Users/user/Downloads/133-627-1- PB.pdf.
- Muñoz, M. (2014). Revista agrícola octubre Retrieved 6 de octubre, 2016, from [http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2014/09/revista\\_agricola\\_octubre\\_36-37.pdf](http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2014/09/revista_agricola_octubre_36-37.pdf)
- Navarro Soto, A. J. (2018). Cuantificación de los compuestos polifenólicos y evaluación de la actividad antioxidante de los extractos Hidroalcohólicos de *Anacardium occidentale* L, *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. y *Gamochaeta purpurea* (L.) Cabrera. Universidad Nacional Mayor de San Marco. Tesis para optar el título profesional de Químico-Farmacéutico.

- Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Scheerens, J. C., & Miller, A. R. (2006). Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1151-1157.
- Pacheco Llamocca, C. E. (2019). Influencia de la temperatura y el pH en la estabilidad de antocianinas de los frutos de Zorzamora (*Rubus urticifolius* Poir.). 114.
- Pavlov I. Roersch C. (1994). Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú. Tomo 1 y 11. Centro de medicina Andina.
- Peguero, F. (2007). Perfil de antocianinas de tres variedades de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en Honduras. Zamorano Carrera de Agroindustria Alimentaria.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). Antioxidantes de los alimentos. *Editorial Acribia, SA Zaragoza. España.*
- Porrás-Loaiza, A., & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-124.
- Ribera, A., Reyes-Díaz, M., Alberdi, M., Zuñiga, G., & Mora, M. (2010). Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in Southern Chile. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(4), 509-536.
- Rosso Y. 2018. Efecto del extracto hidroalcohólico del fruto de *Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endl. (Mullaca) sobre la glicemia en *Rattus norvegicus* var. *albinus* con diabetes inducida. Tesis de Título. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Trujillo, Perú.
- Sanchez D. 2012 Estudio del potencial antioxidante de la mora (*rubus glaucus benth*) y sus cambios en función del proceso de maduración y bajo diferentes temperaturas de almacenamiento. Universidad Nacional de Colombia.  
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20146>

- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Shigematsu S., Ishida S., Hara M., Takahashi N., Yoshimatsu H., Sakata J. y Korthuis RJ. (2003). Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radic Biol Med.* 2003 Apr 1;34(7):810-7. doi: 10.1016/s0891-5849(02)01430-2. PMID: 12654468
- Somova, L., Shode, F., Ramnanan, P. & Nadar, A. (2003). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *Ethnopharmacol*, 84(2-3): 299-305.
- Tao Fan, Jianguo Hu, Lidan Fu, Lijin Zhang,. (2015). Optimización de la extracción asistida por enzimólisis ultrasónica de polisacáridos de *Momordica charabtia* L. mediante la metodología de superficie de respuesta. 115. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.09.009>.
- Tello G. (2015). *Etnobotánica de plantas con uso medicinal en la comunidad de Quero, Jauja, región de Junín. (Tesis para optar el Título profesional de biólogo)*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Torres M. y Cobo M. (2014). “Estudio de diversidad genética de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en tres provincias de la Sierra Ecuatoriana Imbabura, Pichincha y Cotopaxi”. [Tesis] Universidad San Francisco de Quito. Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3332>.
- Teves F, Torres R. (2011). Estudio comparativo de la actividad antioxidante in vitro de los extractos antociánicos y caracterización de las antocianidinas en los frutos de las especies vegetales *Prunus serotina* (Capuli), *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. (Mullak'a), *Monnina* sal. Tesis de Título. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco, Perú.
- Ullauri, A. (2010). Transporte de masa en extracción fase sólido - líquido. Cali, Colombia: Reciteia.

- Villarreal, V., Ramirez, J., Rodríguez, C., y Velasquez, S. (2020). *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl.: Revisión de una Polygonaceae peruana de interés científico. *Ethnobotany Research and Applications*. 19. 10.32859/era.19.16.1-9
- Voko, Z., Hollander, M., Hofman, A., Koudstaal, P.J. y Breteler, M.M. (2003). *Dietary antioxidants and the risk of ischemic stroke*. el estudio de Rotterdam.: *Neurología*, 61 (9), 1273-1275.
- Walford, J. (1980). Historical development of food coloration. *Developments in food colours, 1*, 1-25.
- Wang J, Wang Ju, Ye J, Kranthi S, Raghavan V. (2019) Influencia de los ultrasonidos de alta intensidad sobre los compuestos bioactivos del jugo de fresa: perfiles de ácido ascórbico, fenólicos, actividad antioxidante y microestructura. Volume 96, Pag. 128-136, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.007>
- Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., & Zhao, J. (2008). Optimisation of conditions for the preparation of  $\beta$ -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food chemistry*, 107(3), 1300-1306.
- Zorrilla García, A. E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 178-185
- Zamora, J. (2009). Antioxidantes micronutrientes en lucha por la salud. *Rev. Chile. Nutrición.*, Vol. 34(1):1-24.
- Zapata, LM. (2014). Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria [Tesis doctoral]. Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/39105>
- Zorrilla García, A. E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 178-185.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Frutos de *Muehlembeckia volcánica* (MULLACA).



**Anexo 2.** Extracción y filtración de pigmentos antociánicos de muestras de frutos de *Muehlembeckia volcánica* (MULLACA).



Anexo 3. Contenido de antocianinas Totales CAT por método pH diferencial.  
Muestra de tratamientos.



#### Anexo 4. Espectrómetro FTIR – ATR de antocianinas



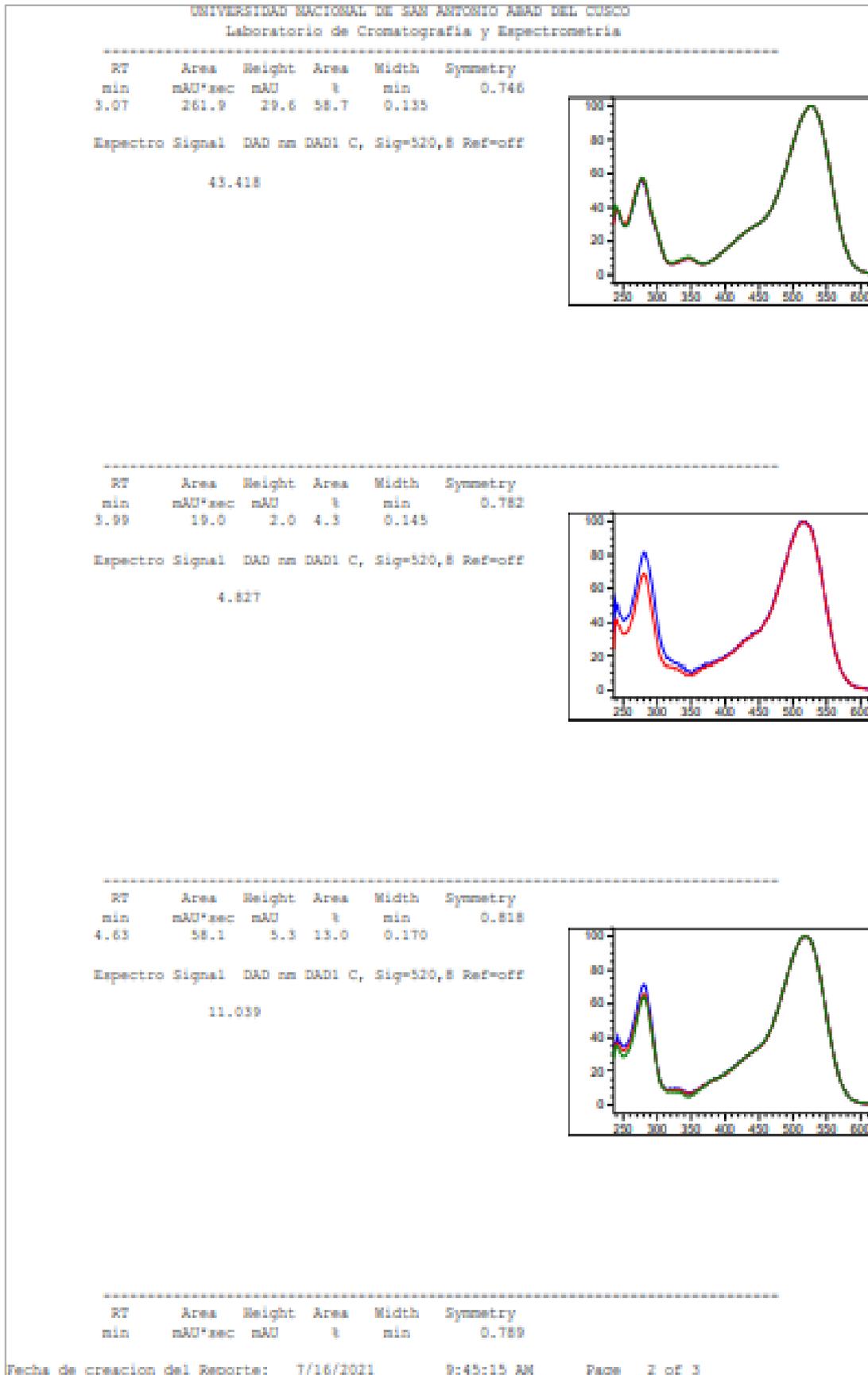
**Anexo 5.** Análisis de varianza (ANOVA) de contenido de antocianinas totales- CAT

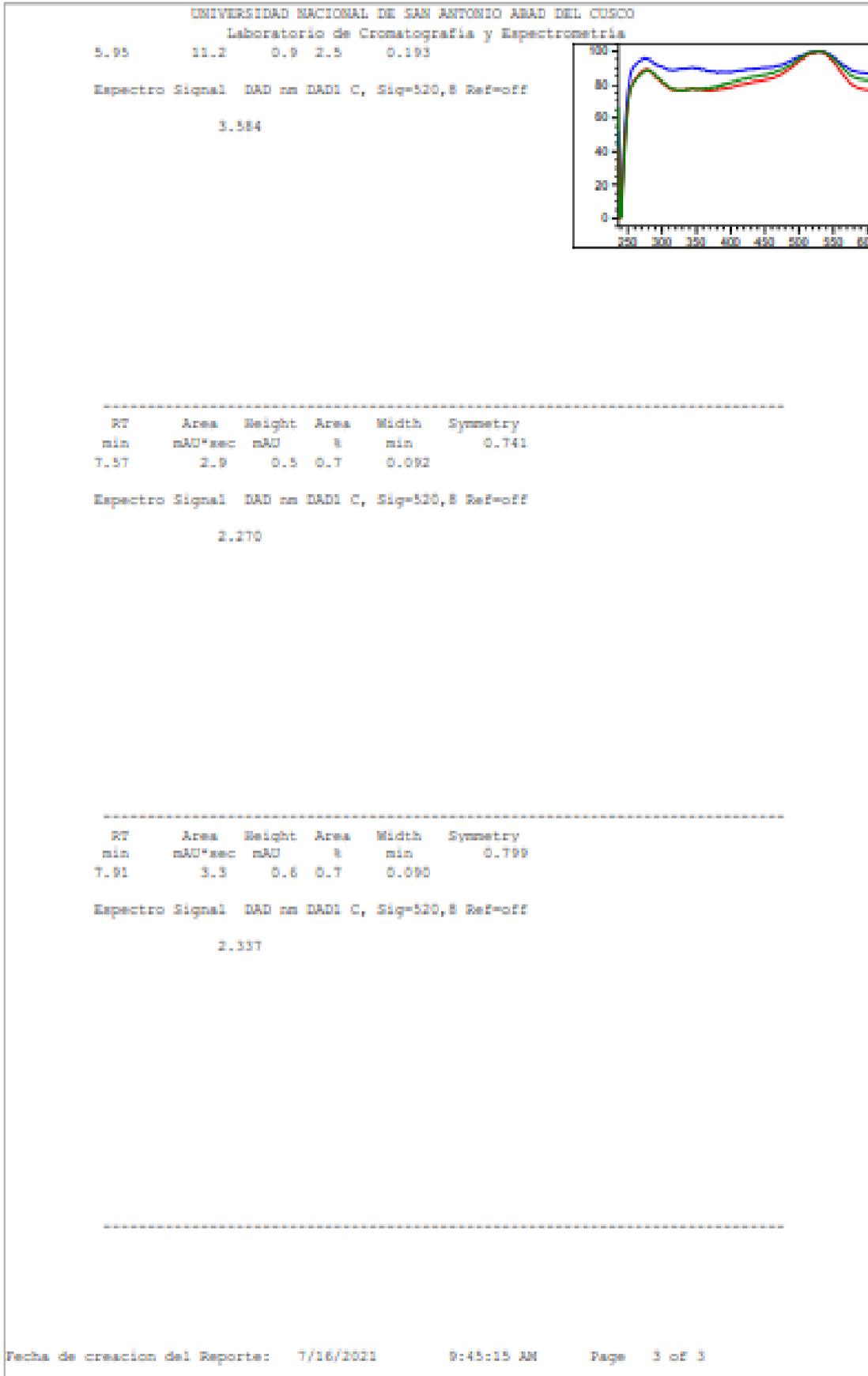
<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F<sub>0</sub></b>	<b>Valor-P</b>
A: Temperatura °C	1	23.9434	23.9434	0.10	0.7559
B: pH	1	0.37978	0.37978	0.00	0.9687
C: Tiempo	1	178.727	178.727	0.78	0.4064
A <sup>2</sup>	1	379.127	379.127	1.66	0.2392
B <sup>2</sup>	1	242.659	242.659	1.06	0.3376
C <sup>2</sup>	1	9.1451	9.1451	0.04	0.8473
AB	1	383.922	383.922	1.68	0.2365
AC	1	218.405	218.405	0.95	0.3614
BC	1	210.125	210.125	0.92	0.3701
Error total	7	1603.46	229.066		
Total (corregido)	16	3132.39			

**Anexo 6.** Coeficientes de regresión para predecir el contenido de antocianinas totales- CAT (mg cianidina 3-glucosido/100g).

<b>Coefficiente</b>	<b>Estimado</b>
Constante	-389.93
A: temperatura	4.56
B: pH	181.76
C: tiempo	0.77
A <sup>2</sup>	-0.01
B <sup>2</sup>	-16.17
C <sup>2</sup>	0.00
AB	-0.69
AC	-0.00
BC	-0.17







## DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Ruth Mery Ccopa Flores,  
identificado con DNI 02297881 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado  
Magister Scientiae en Agricultura Andina, Especialidad de Ciencia y Tecnología de Alimentos

informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:

“ Optimización del proceso de extracción y evaluación de compuestos bioactivos  
en frutos de mullaca (Muehlebeckia volcánica) ”

Es un tema original.

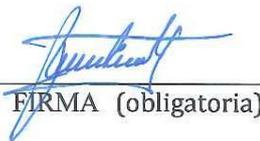
Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 14 de setiembre del 20 23

  
FIRMA (obligatoria)



Huella



## AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Ruth Mery Ccopa Flores,  
identificado con DNI 02297881 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado

Magister Scientiae en Agricultura Andina, Especialidad de Ciencia y Tecnología de Alimentos  
informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:

“ Optimización del proceso de extracción y evaluación de compuestos bioactivos en  
frutos de mullaca ( Muehlebeckia volcánica) ”

para la obtención de  Grado,  Título Profesional o  Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 14 de setiembre del 2023

FIRMA (obligatoria)



Huella